

**DIE ÖDEMPROTEKTIVE WIRKUNG VON
BENZARON UND TRIMETHYLHESPERIDINCHALKON
IN ABHÄNGIGKEIT VON
DOSIS UND APPLIKATIONSART**

PETRA FUCHS

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität München

Vorstand: Prof.Dr.med.W.Forth

Die ödemprotektive Wirkung von Benzaron und
Trimethylhesperidinchalkon in Abhängigkeit
von Dosis und Applikationsart

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Petra Fuchs
aus Schwabmünchen

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med.W.Felix

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med.W.Forth
Prof.Dr.med.A.Baethmann

Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 30.04.1987

Danke

meinen Eltern

und den Freunden,
die mich auf meinem Weg begleitet haben.

1. Einleitung
2. Prinzip des Versuches
3. Übersicht über die verwendeten Substanzen
 - 3.1. Etacrynsäure
 - 3.2. Flavonoide
 - 3.3. Trimethylhesperidinchalkon
 - 3.4. Benzaron
4. Eigene Untersuchungen
 - 4.1. Ziel der Untersuchungen
 - 4.2. Methodik
 - 4.2.1. Versuchstiere
 - 4.2.2. Untersuchte Substanzen
 - 4.2.3. Versuchsanordnung
 - 4.2.3.1. Präparation
 - 4.2.3.2. Perfusion und Meßanordnung
 - 4.2.3.3. Proteinmarkierung
 - 4.2.3.4. Endothelschädigung
 - 4.2.3.5. Auswertung und Ödem Erfassung
 - 4.2.4. Versuchsablauf
 - 4.2.5. Methoden der Versuchsauswertung
 - 4.2.5.1. Herstellung von Gewebeproben
 - 4.2.5.1.1. Bestimmung des Flüssigkeitsgehaltes
 - 4.2.5.1.2. Bestimmung des Eiweißgehaltes
 - 4.2.5.2. Blutproben
 - 4.2.5.3. Transkapillärer Flüssigkeitsaustausch
 - 4.2.5.4. Kreislauf und Atmung
 - 4.2.5.5. Statistische Auswertung
 - 4.3. Ergebnisse
 - 4.3.1. Kontrollversuche
 - 4.3.2. Versuche mit Benzaron
 - 4.3.3. Versuche mit TMHC
 - 4.3.3.1. Versuche mit intravenöser Applikation
 - 4.3.3.2. Versuche mit oraler Applikation
 - 4.3.3.3. Versuche mit oraler Applikation an aufeinanderfolgenden Tagen

5.	Diskussion	101
5.1.	Anmerkungen zur Methodik	102
5.1.1.	Proteinmarkierung mit Evans blue	102
5.1.2.	Präparation	103
5.1.3.	Perfusionstechnik	104
5.1.4.	Venenvolumen	105
5.1.5.	Beinspülung	106
5.2.	Eigene Ergebnisse	107
6.	Zusammenfassung	110
7.	Literaturverzeichnis	111

1. Einleitung

Von Erkrankungen der peripheren Venen sind ca. 70% der Gesamtbevölkerung im Alter über 15 Jahren betroffen (Marshall 1983). Unter dem Begriff des varikösen Symptomenkomplexes werden alle Erscheinungen der venösen Veränderungen von Besenreisern bis zur Stammvarikosis, aber auch die chronische Veneninsuffizienz mit ihren trophischen Störungen sowie Komplikationen wie Thrombophlebitis und Lungenembolie subsumiert.

Diese Krankheitseinheit und ihre Therapie sind daher von großem sozialmedizinischen Interesse. Neben der physikalischen und operativen Therapie kommt der medikamentösen Behandlung dabei ein großer Stellenwert zu. Die dabei verwendete Vielzahl von Pharmaka hat verschiedene Angriffspunkte und zielt auf eine Beeinflussung von z.B. Blutviskosität und Gefäßtonus oder Ödemausschwemmung ab.

Daneben kommen auch noch die sogenannten "Venennmittel" zur Anwendung, zu denen vor allem die Flavonoide sowie das synthetische Benzaron gezählt werden, und deren hauptsächliche Wirkung in der Verminderung der Kapillarpermeabilität und der Erhöhung der Kapillarresistenz besteht.

Für die Behandlung einer chronischen Krankheit stellt die orale Verabreichung die einzig sinnvolle Therapieform dar. Es mußte daher untersucht werden, ob die Substanzen, die sich in zahlreichen experimentellen Untersuchungen (z.B. Warter et al. 1946, Deltour et al. 1963, Felix 1978) als wirksam erwiesen hatten, auch nach oraler Applikation eine ödemprotektive Wirkung entfalten.

Dies ist nicht ohne weiteres zu erwarten, da pharmakokinetische Grundlagen besagen, daß gut wasser- und schlecht fettlösliche Stoffe nach oraler Applikation nicht ausreichend absorbiert werden, da sie die Magen-Darm-Mucosa nicht ausreichend durchdringen können.

Die Arbeiten von Förster (1978), der bei Pflanzenfressern eine 4-10-%ige Resorption feststellte, und die Tatsache, daß sich Flavonoide und Benzaron auch in klinischen Studien

(z.B. Thébault 1983, Rudofsky 1985) als wirksame Venenmittel erwiesen haben, deuten jedoch darauf hin, daß hier die tatsächlich ablaufenden Vorgänge den pharmakokinetischen Überlegungen widersprechen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß die bei intravenöser und intraperitonealer Verabreichung antiödematös wirksamen Substanzen Trimethylhesperidinchalkon (TMHC) und Benzaron nach oraler Applikation ihre antiödematöse Wirkung entfalten können.

Im Hinblick darauf, daß die Behandlung des varikösen Symptomenkomplexes die Behandlung einer chronischen Krankheit darstellt und also eine Dauertherapie ist, wurde untersucht, ob eine chronische, d.h. an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführte, Verabreichung niedriger Wirkstoffdosen zu einem kumulativen Effekt führt und so eine Dosisverminderung ermöglicht.

2. Prinzip der Untersuchung

Unsere Versuche wurden an dem von Felix (1978) beschriebenen Ödemmodell durchgeführt.

Dieses Modell beruht auf einer Schädigung des Gefäßendothels durch Etacrynsäure, wodurch dieses für Eiweiß durchlässig wird. Es entsteht ein morphologisches, d.h. eiweißreiches Ödem, das wie Hammersen und Hammersen (1983) gezeigt haben, nicht entzündlicher Genese ist.

Das Ödem wird quantitativ beschrieben durch

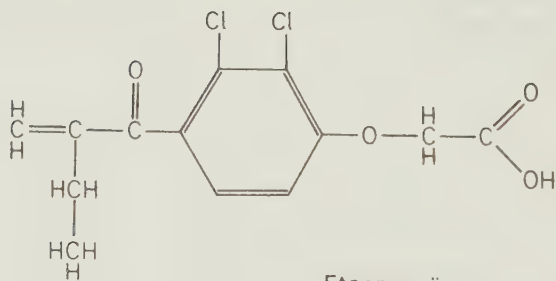
- 1) den Flüssigkeitsgehalt und
- 2) den Proteingehalt des Gewebes.

Die Untersuchungen wurden an den hinteren Extremitäten von Katzen durchgeführt.

3. Übersicht über die verwendeten Substanzen

3.1. Etacrynsäure

Die zur Endothelschädigung verwendete Etacrynsäure ist ein Derivat der Phenoxyessigsäure.



Etacrynsäure

Klinisch kommt die Substanz als stark wirksames Diuretikum zur Anwendung, das im Gegensatz zu den Benzothiaziden nicht nur die Natriumrückresorption sondern auch den aktiven Chloridtransport im aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife hemmt.

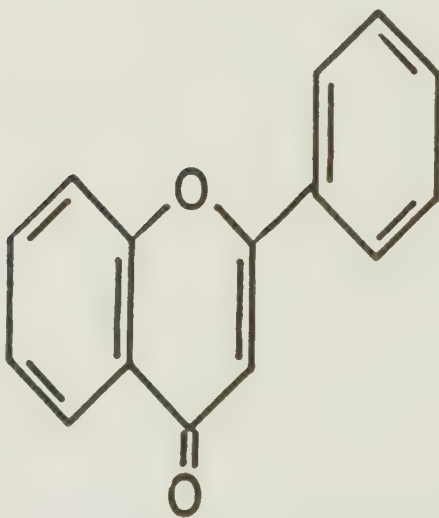
Als Wirkungsmechanismus für diese Beeinflussung des Ionenaustausches an den Zellmembranen werden Bindungen der Etacrynsäure

mit Sulfhydrylgruppen des Gewebes angesehen, die zu einer Hemmung des aktiven Natriumtransportes und der Glykolyse, einer Beeinflussung der Na-K-ATPase (Mortais und Cousin 1976) sowie einer Hemmung der Na-K-Mg-abhängigen ATPase (Duggan und Noll 1965) führen.

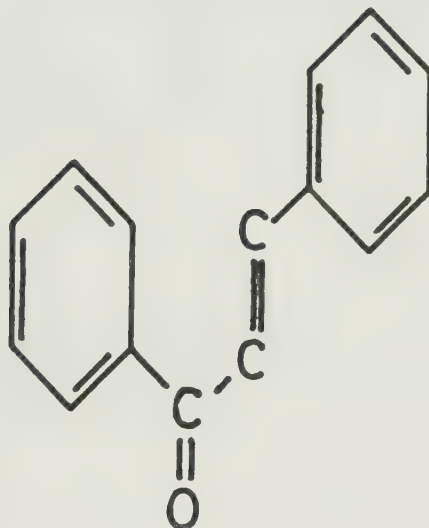
In Abhängigkeit von Konzentration (Petersen et al. 1979) und Inkubationszeit (Duggan und Noll 1965) vermag die Etacrynsäure Zellschäden auszulösen, deren Ausprägung zwischen leichtem Zellödem und völligem Zelluntergang schwanken kann. Diese Eigenschaft macht die Etacrynsäure geeignet für die Verwendung beim hier beschriebenen Ödemmodell von Felix, sie hat jedoch in der klinischen Anwendung zu ernsthaften Zwischenfällen durch die Entstehung von Gewebsnekrosen bei intraarterieller oder versehentlicher paravenöser Injektion geführt.

3.2. Flavonoide

Vor 50 Jahren entdeckte Szent-Györgyi bei Arbeiten mit dem Vitamin C eine Substanz, der damals der Name "Vitamin P" gegeben wurde. Der Vitamincharakter dieser Substanz, die in einer Vielzahl von Pflanzen gefunden wurde, ließ sich jedoch nicht beweisen. Heute werden die gelben Farbstoffe dieser Stoffgruppe Flavonoide genannt. Als Flavonoide werden Abkömmlinge des Flavons bezeichnet oder allgemeiner Substanzen, die eine $C_6-C_3-C_6$ -Gruppierung aufweisen.



Da zwischen den Ringen A und B kein Ringschluß vorliegen muß, zählt auch das Chalkon zu den Flavonoiden (Schmidt 1978).



Weitere Substanzen dieser Gruppe ergeben sich durch Substitution der Wasserstoffatome durch OH-Gruppen, die ihrerseits wieder in der Lage sind, glykosidische oder ätherartige Bindungen einzugehen.

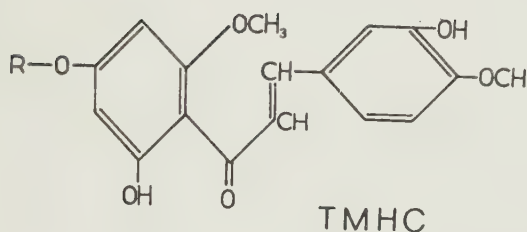
Flavonoide werden in fast allen pflanzlichen Geweben gefunden und sind dort an einer Vielzahl chemischer Prozesse wie z.B. der Photosynthese beteiligt (Havsteen 1983; Voelter et al. 1983). Neben der Mitwirkung an der Atmungskette pflanzlicher und tierischer Zellen ist vor allem die Bindung der Flavonoide an eine Vielzahl von Enzymen, wie z.B. Hyaluronidase und membranständige ATPasen erwähnenswert, die zu einer Hemmung der Enzyme führt (Havsteen 1983).

Klinisch bedeutsam ist die membranabdichtende, bindegewebsstärkende und venentonisierende Wirkung der Flavonoide (Havsteen 1983). Letztere kommt durch eine Freisetzung präsynaptisch gespeicherten Noradrenalins und direkte Sensibilisierung der α -Rezeptoren zustande (Thébault 1983). Daneben wird den Flavonoiden auch eine Hemmwirkung auf die Katechol-O-Methyltransferase (COMT) zugeschrieben. Durch die Hemmung dieses Enzyms, das das im synaptischen Spalt befindliche Adrenalin und Noradrenalin zu inaktiven Metaboliten abbaut, kommt es zu einer Erhöhung der Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt.

Resorption, Metabolismus und Elimination werden durch den Grad der Hydroxyethylierung beeinflusst. Mit zunehmender Hydroxyethylierung steigt das Ausmaß der Resorption nach oraler Verabreichung und das der renalen Elimination; die Hydrolyse zu Aglykonen, dem biliären Hauptmetaboliten, bleibt von dieser Substitution unbeeinflusst (Griffiths und Barrow 1972).

3.3. Trimethylhesperidinchalkon

TMHC ist ein halbsynthetisches Derivat des natürlicherweise in den meisten Zitrusfrüchten vorkommenden Hesperidins (Chanal 1980).

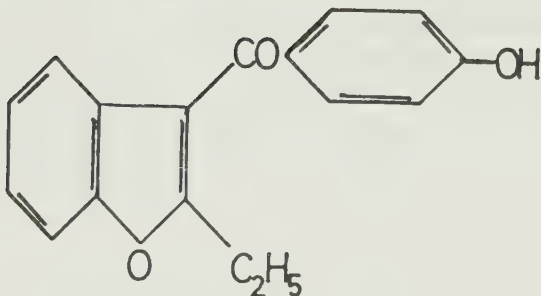


Seine membranstabilisierende Wirkung konnte an unterschiedlichen Ödemmodellen nachgewiesen werden, z.B. bei Ödemauslösung durch Ovalbumin, subcutane Injektion von Crotonöl und Bestrahlung mit UV-Licht sowie durch intracutane Injektionen von Bradykinin und Hyaluronidase. Diese membranstabilisierende Wirkung des TMHC wirkt sich jedoch nur bei gesteigerter Gefäßwandpermeabilität aus. Rudofsky und Nobbe (1982) konnten zeigen, daß bei der Anwendung von TMHC bei gesunden Probanden eine Steigerung des Venentonus im Vordergrund stand.

Zum Wirkungsmechanismus liegen unterschiedliche Auffassungen vor. De Eds (1958) hält eine Wirkung des TMHC auf die den Kapillaren vorgeschalteten Arteriolen für wahrscheinlicher als eine direkte Wirkung auf die Porenstruktur. Lockett (1958) hält jedoch eine direkte Veränderung des Porendurchmessers für das Wirkungsprinzip. Gounon (1980) sieht die Kapillaren als Teil eines "mikrozirkulatorischen Komplexes" aus Lymphgefäßen, hormonellen und humoralen Einflüssen und umgebendem Bindegewebe. Das TMHC würde nach dieser Hypothese den Zustand des Bindegewebes derart beeinflussen, daß es in der Lage wäre, einer Ödementstehung entgegenzuwirken.

3.4. Benzaron

Zwischen dem Benzaron und den Flavonoiden besteht durch Vinylogie eine Beziehung. Vinyloge sind Substanzen mit grundsätzlich identischen Bestandteilen, die sich dadurch unterscheiden, daß diese Bestandteile mit dem Grundkern einmal durch direkte Bindungen, im anderen Fall durch indirekte Bindungen verknüpft sind (Binon 1976).



Die Hauptwirkung des Benzarons besteht in einer Erhöhung der Kapillarresistenz und einer Senkung der Kapillarpermeabilität. Diese Wirkungen wurden in zahlreichen Untersuchungen bestätigt (z.B. Deltour 1963, Felix 1978 a, Felix und Hällfritzsch 1978). Charlier (1976) fand beim Benzaron eine vergli-

chen mit TMHC sechsmal und mit Rutin sechzehnmal stärkere Senkung der Kapillarpermeabilität.

Daneben wirkt Benzaron durch Hemmung der Plättchenadhäsivität und eine Beschleunigung der Desaggregation antithrombotisch (Brotelle 1976) und durch Plasminogen-Aktivierung fibrinolytisch (Barchewitz 1972). Durch die genannten Eigenschaften und eine Steigerung der fibrinolytischen Aktivität der Intima varikös veränderter Venen hat Benzaron auch eine Bedeutung für die Thromboseprophylaxe (Niethard und Dustmann 1977, Haas et al. 1982). Barchewitz et al. (1972) beschreiben sogar nicht nur eine vollständige funktionelle Rekanalisation sondern auch eine morphologische Rekonstruktion der geschädigten Arterienwand.

Einen Einsatz des Benzarons bei der Prävention der Arteriosklerose durch Senkung der LDL-Aufnahme in die Zellen diskutieren Filipovich und Buddecke (1979), auch Mörl (1980) wies eine signifikante Abnahme von Serum-Cholesterin, Triglyceriden und Serum-Harnsäure nach.

4. Eigene Untersuchungen

4.1. Ziel der Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der pharmakologische Grundsatz, daß gut wasser- und schlecht fettlösliche Substanzen durch die Mucosa des Magen- Darmtraktes nur in ungenügendem Ausmaß absorbiert werden, auch für die Substanzen Benzaron und Trimethylhesperidinchalkon (TMHC), die diese Eigenschaften aufweisen, zutrifft. Von den genannten Substanzen ist bekannt, daß sie nach parenteraler Applikation antiödematös wirksam sind. Um Aufschluß über das pharmakokinetische Verhalten der beiden Substanzen zu erhalten, wurde ihre Wirkung nach intravenöser Verabreichung mit der nach oraler Applikation verglichen.

Bei nachgewiesener Wirksamkeit nach oraler Applikation sollte untersucht werden, ob durch "chronische", d.h. an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen erfolgende, orale Verabreichung eine Dosisreduktion erreicht werden kann. Dieses Phänomen wird auf einen kumulativen Effekt bei langen Plasmahalbwertszeiten und eine hohe Gewebeverankerung zurückgeführt.

4.2. Methodik

4.2.1. Versuchstiere

Es wurden 27 Versuche mit 18 weiblichen und 9 männlichen Katzen mit einem Körpergewicht zwischen 1,9 und 3,5 kg durchgeführt.

Aus der Versuchsreihe von Nieberle (1985) und Schmidt (1985) wurden 21 Versuche an 13 weiblichen und 8 männlichen Katzen mit einem Körpergewicht zwischen 2,0 und 3,1 kg ausgewertet. In den zu vergleichenden Untersuchungen herangezogenen Versuchen war TMHC in von mir nicht geprüften Verabreichungsformen untersucht worden. Zur Vermeidung von Doppelversuchen habe ich davon Abstand genommen, diese Versuche nochmals selbst durchzuführen.

4.2.2. Untersuchte Substanzen

Bei 15 Versuchen wurde die antiödematöse Wirkung von Benzaron untersucht. Dazu wurde die Substanz in Dosierungen von 0,5, 2,5 und 10 mg/kg KG, in Wasser gelöst, gleichzeitig mit der Chloralose oral verabreicht.

Bei 5 Untersuchungen wurden die Tiere 4 Tage lang mit 20 mg TMHC/kg KG vorbehandelt, d.h. den nüchternen Tieren wurde an 4 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils die angegebene Dosis TMHC in Pulverform als Einzeldosis oral verabreicht.

4.2.3. Versuchsanordnung

4.2.3.1. Präparation

In die durch Tracheotomie eröffnete Trachea wurde eine Glaskannüle eingebunden, die das Absaugen der Atemwege und das Anschließen eines Thermistors (Felix 1962) zur Registrierung der Luftströmung in der Trachea erlaubte.

Nach sorgfältiger Rasur beider hinterer Extremitäten erfolgte an beiden Beinen die Durchtrennung der Oberschenkelhaut durch einen Schnitt, der vom Lig. inguinale bis etwa 6 cm nach distal reichte. Hierbei durchtrennte Hautgefäße wurden ligiert. A. und V. femoralis sowie der N. femoralis wurden beidseits dargestellt.

Am "Ödembein" wurden alle Abgänge der A. femoralis (incl. Aa. circumflexae femoris) zwischen Lig. inguinale und Abgang der A. genicularis ligiert. Auf einer entsprechenden Länge wurden alle Zuflüsse zur V. femoralis unterbunden. Nach Inzision auf der Dorsalseite des Beines und Auseinanderdrängung der Mm. glutei wurde der N. ischiadicus dargestellt und angeschlungen. Anschließend wurde die Muskulatur des Beines in zwei Portionen mit schmalen Plastikbändern umschlungen und abgebunden, wobei A., V. und N. femoralis sowie der N. ischiadicus geschont wurden. Diese Präparation war notwendig, um sicherzustellen, daß alle Kollateralen zwischen systemischem Kreislauf und Ödembein unterbrochen sind, und Zu- und Abfluß allein über A. und V. femoralis erfolgen. In A. und V. femoralis wurde je ein mit physiologischer Kochsalzlösung und Heparin (2.500 IE/kg KG in 40 ml 0,9%igem NaCl) gefülltes PVC- Schlauchsystem- im folgenden Meßanordnung genannt- eingebunden.

Am "Kontrollbein" wurden auf einer Länge von ca. 4 cm die Zuflüsse zur V. femoralis unterbunden. In dieses Gefäß wurde ein kleiner PVC- Ring eingebunden, über den die i.v.- Applikationen systemisch zu verabreichender Substanzen erfolgte.

Die als "Ödembein" bezeichnete hintere Extremität unterscheidet sich durch die Präparation vor allem in folgenden Punkten von der "Kontrollbein" genannten hinteren Extremität:

- Das Ödembein wird über Meßanordnungen mit einer Rollenpumpe verbunden, die das Bein strömungskonstant durchblutet.
Das Kontrollbein wird während des ganzen Versuches physiologisch durchblutet.
- Das Ödembein kann vom systemischen Kreislauf abgetrennt und isoliert mit der gefäßschädigenden Substanz perfundiert werden.

4.2.3.2. Perfusion und Meßanordnung

In den Verlauf der arteriellen Meßstrecke wurde eine Rollenspumpe eingefügt, über die auch das Blut in der venösen Meßstrecke geleitet wurde. Dadurch wurde eine strömungskonstante Perfusion des Ödembeins erzielt, d.h. die Pumpe transportierte pro Zeiteinheit die gleiche Menge arteriellen und venösen Blutes - unabhängig vom Tonus der Widerstandsgefäße.

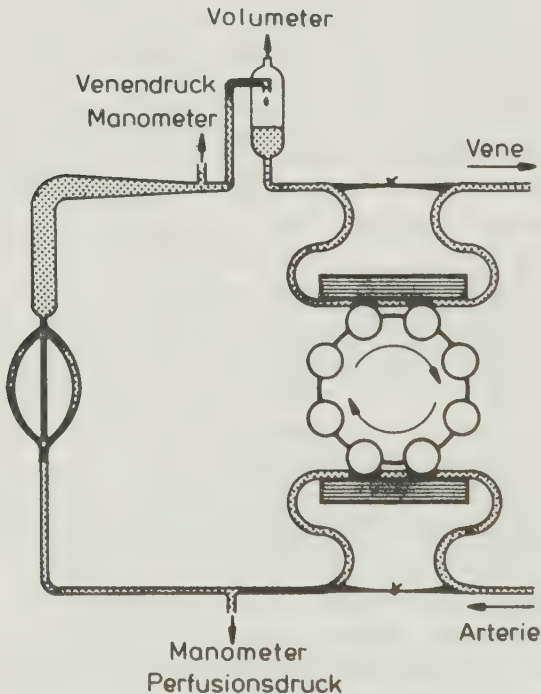


Abb. 1 Perfusionstechnik

Zwischen Pumpe und Kapillargebiet wurde über den arteriellen Teil der Meßanordnung der Perfusionsdruck gemessen.

Auf der venösen Seite war zwischen Bein und Pumpe eine sog. Überlaufkammer eingefügt, die mit einem Volumeter (Felix 1971) zur Aufzeichnung von Volumenänderungen verbunden war. In Abhängigkeit von der Höhe, in der die Überlaufkammer fixiert war, veränderte sich der venöse Ausflußdruck und damit das Verhältnis von Nettofiltration und Nettoabsorption. Die Überlaufkammer wurde für die Versuche in der Höhe angebracht, durch die ein isovolumetrischer Zustand hergestellt wurde.

4.2.3.3. Proteinmarkierung

Zur Ermittlung des Plasmaproteingehaltes des Gewebes wurde die Farbstoffmethode nach Beach und Steinetz (1961) angewandt, die systemische Markierung von Plasmaproteinen mit Evans blue.

4.2.3.4. Endothelschädigung

In allen Versuchen wurde das Endothel mit 0,1%-iger Etacrynsäure geschädigt.

Die Etacrynsäure sollte nur in die eine hintere Extremität, das Ödembein, gelangen und sich nicht systemisch verteilen. Deshalb wurde das Ödembein sowohl von der Blutzufuhr aus dem Körper als auch von der Rollpumpe abgetrennt, wodurch gewährleistet war, daß die Etacrynsäure nur in das Ödembein gelangte und keine systemische Wirkung entfalten konnte.

Zuerst wurde mit Hilfe einer Infusionspumpe mit NaCl 0,9% gespült, um das in den Gefäßen befindliche Blut herauszuwaschen. Danach erfolgte wiederum eine Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung, durch die die Etacrynsäure aus den Gefäßen gewaschen wurde, bevor durch Öffnen der Meßanordnungen die Verbindung zum systemischen Kreislauf wieder hergestellt wurde.

4.2.3.5. Auswertung und Ödemerfassung

Der Gehalt an Ödemflüssigkeit und -protein wurde durch den Vergleich zwischen Kontroll- und Ödembein nach den unten beschriebenen Methoden ermittelt.

4.2.4. Versuchsablauf

Als Anästhetikum wurde den nüchternen Tieren über eine Magensonde in Wasser gelöste Chloralose in einer Dosierung von 60 mg/kg KG verabreicht. Nach ca. 60 Minuten war eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, die während der gesamten Versuchsdauer von ungefähr 6 Stunden anhielt. Da bei 20 Versuchstieren die analgetische Komponente der Narkose zu gering ausgeprägt war, erhielten sie vor Beginn des Versuches 1-3 ml Ketanest^R i.m. Danach wurde die Präparation wie oben beschrieben ausgeführt.

Der Ablauf der Versuche nach Beendigung der Präparation ist in Abb. 2 dargestellt.

SCHÄDIGUNGSPHASE								
-70	//		-10	0	10	20	65 min	
BLUT			NaCl	ETACRYN- SÄURE	NaCl	BLUT		
NORMALE	ISOLIERTE			NORMALE PERFUSION				

Abb. 2 Zeitablauf des Versuches

Zu Beginn eines jeden Versuches wurde bei strömungskonstanter Perfusion mit Blut ein isovolumetrischer Zustand hergestellt. Sobald dies erreicht war, wurde zur Ermittlung des Gesamteiweißgehaltes venöses Blut entnommen. Im Anschluß daran erfolgte bei Versuchen mit intravenöser Pharmakongabe die entsprechende Applikation. Von diesem Moment an erfolgten die weiteren Schritte zu genau festgelegten Zeitpunkten. 15 Minuten nach Pharmakongabe bzw. gleich nach der Blutentnahme wurde die Proteinmarkierung durch intravenöse Verabreichung von Evans blue in einer Menge von 50 mg/kg KG vorgenommen. 10 Minuten

nach der Farbstoffapplikation wurde erneut venöses Blut zur Ermittlung der maximalen Farbstoffkonzentration entnommen. Während des darauffolgenden, Schädigungsphase genannten, Abschnittes wurde das Ödembein von systemischem Kreislauf und Rollpumpe abgetrennt und mit Hilfe einer Pumpe druckkonstant perfundiert.

Zuerst wurde das Bein mit 50 ml physiologischer Kochsalzlösung (5 ml/min) blutleer gespült, um eine Bindung der Etacrynsäure an Blutbestandteile zu verhindern. Das Perfusat wurde aufgefangen, gemessen und bis auf die ersten 15 ml, die den Tieren während der Endperfusion zur Kreislaufunterstützung reinfundiert wurden, verworfen. Der venöse Ausflußdruck war während der ganzen Schädigungsphase auf Null gesenkt.

Daran schloß sich die Perfusion mit der ödemerzeugenden Substanz, 50 ml Etacrynsäure zu 0,1% in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/min. an. Die Perfusatsmenge wurde wiederum aufgefangen, bestimmt und verworfen. Der Beginn der Etacrynsäureperfusion stellt den Nullpunkt der Zeitmessung dar.

Um sicherzustellen, daß die Etacrynsäure nicht in den Körperkreislauf gelangt und systemische Wirkung entfaltet, wurde nach Abschluß der Einwirkzeit die Etacrynsäure mit 50 ml 0,9%-iger Kochsalzlösung ausgewaschen. Das Perfusat wurde wiederum aufgefangen, gemessen und verworfen. Dieses Vorgehen diente jeweils zur Bestimmung der im Bein verbliebenen Flüssigkeitsmengen, da bereits während der Schädigungsphase ein Übertritt von Flüssigkeit ins Gewebe einsetzte.

Der Übertritt von Protein setzte erst mit Beginn der auf die Schädigungsphase folgenden erneuten Perfusion mit Blut, der sogenannten Endperfusion, ein. Nach 45 Minuten wurden die Tiere getötet, und die Gewebeproben wie unten beschrieben entnommen und aufgearbeitet.

4.2.5. Methoden der Versuchsauswertung

4.2.5.1. Herstellung von Gewebeproben

Von Ödembein und Kontrollbein wurden Haut und Muskulatur abgetragen. Die Proben wurden mit einem Mixer zerkleinert, zweigeteilt und gewogen. Von jedem Bein entstanden also 2 Haut- und 2 Muskelproben, die auf ihren Gehalt an Flüssigkeit und Protein untersucht wurden.

4.2.5.1.1. Bestimmung des Flüssigkeitsgehaltes

Je eine Haut- und Muskelprobe eines jeden Beines wurden in einem Hitzeschrank bei 120°C 12 Stunden getrocknet.

Der Flüssigkeitsgehalt der Proben wurde aus der Differenz zwischen Feucht- und Trockengewicht ermittelt und auf 1 g Gewebe umgerechnet. Das Ausmaß des transkapillären Flüssigkeitsübertrittes im Ödembein wurde durch den Vergleich mit dem Kontrollbein ermittelt.

4.2.5.1.2. Bestimmung des Eiweißgehaltes

Die verbliebenen Proben wurden mit rauchender Salzsäure versetzt. Nach 12-stündiger Mazeration wurde 10%-iges Zephirol zugegeben (Mengenangaben siehe Tab.1). Nach etwa 20 Minuten hatte sich ein wasserunlöslicher Komplex aus Zephirol und Evans blue gebildet. Dieser wurde mit Chloroform ausgeschüttelt.

Tab. 1 Verwendete Mengen von Salzsäure, Zephirol und Chloroform zur Aufarbeitung von Gewebe- und Blutproben (in ml)

	30%	10%	
	Salzsäure	Zephirol	Chloroform
Muskel	10	20	20
Haut	10	20	20
Blut	2	4	4

Nachdem das Evans blue durch Schütteln in die Chloroformphase übergetreten war, wurde durch Zentrifugieren eine Auftrennung in 3 Phasen erreicht:

Zephirolphase

Trennschicht aus nicht mazeriertem Gewebe

Chloroform mit Evans blue.

Mit einer Kanüle, die durch die Trennschicht hindurch in die Chloroformphase vorgeschoben wurde, wurde Chloroform mit Evans blue aspiriert. In einem Zeiss-Photometer wurde die Farbstoffkonzentration bei 620 nm gegen reines Chloroform bestimmt.

Mit Hilfe der durch die Auswertung der Blutproben erhaltenen Referenzwerte wurde der Proteingehalt des Gewebes bestimmt und auf 1 g Gewebe umgerechnet. Dies geschah mit Hilfe der unten aufgeführten Gleichungen I - IV. Die aufgrund der Gefäßschädigung ins Ödembein übergetretene Proteinmenge ergab sich aus dem Vergleich mit dem Kontrollbein.

4.2.5.2. Blutproben

Zur Berechnung des Proteingehaltes der Gewebeproben mußten aus den Blutproben die Referenzwerte Gesamtprotein und die Plasma - Extinktionswerte vor und nach Evans-blue-Gabe bestimmt werden. Die während des Versuches entnommenen Blutproben wurden dafür wie Gewebeproben behandelt und dienten zur Messung folgender Werte:

Blut 0 Entnahme bei Versuchsbeginn

Ermittlung des Gesamtproteins nach Biuret

Blut I Entnahme 10 min nach Beendigung der Evans-blue-Gabe

Ermittlung der maximalen Farbstoffkonzentration

Blut II Entnahme 5 min vor Versuchsende

Ermittlung des Farbstoffgehaltes nach Endothelschädigung;

dieser Wert hatte Kontrollfunktion und ging nicht in die Berechnung des Gewebeproteins ein.

Mit diesen durch die Aufarbeitung der Blutproben erhaltenen Referenzwerten ließ sich mit folgenden Rechenschritten der Proteingehalt/g Trockengewicht errechnen.

(I) Berechnung der Extinktion von 1 mg Protein/ml Chloroform

$$E_0 = \frac{(E_2 - E_1) \times 0,96 \times 4}{G}$$

E_2 = Extinktion des Plasmas nach Evans blue Gabe (Blut I)

E_1 = Extinktion des Plasmas vor Evans blue Gabe (Blut 0)

0,96 = 96%-ige Bindung des Farbstoffes an das Protein

4 = Extraktion erfolgt in 4 ml Chloroform

G = Eiweißkonzentration des Plasmas in g/100 ml (Biuret)

(II) Proteingehalt der Probenextraktion in 1 ml Chloroform

$$P = \frac{E}{E_0} \times C$$

P = Proteingehalt

E = Extinktion der Probe

E_0 = siehe oben

C = Chloroformmenge der Probenaufbereitung

(III) Berechnung des Proteingehaltes / g Trockengewicht

$$T = G_1 \times \frac{C_2}{C_1}$$

T = Trockengewicht der aktuellen Probe

G_1 = Feuchtgewicht der aktuellen Probe

C_1 = Feuchtgewicht der Probe vor dem Trocknen

C_2 = Trockengewicht

P

(IV) Proteingehalt / g Trockengewicht = -----

T

4.2.5.3. Transkapillärer Flüssigkeitsaustausch

Mit dem an der Überlaufkammer angeschlossenen Volumeter (Felix, Remien, Hällfritsch 1971) wurde der transkapilläre Flüssigkeitsaustausch registriert. Ein Abfallen der Kurve war Folge einer Nettofiltration, eine Nettoabsorption führte zu einem Anstieg der Kurve.

Die zu Beginn der Endperfusion einsetzende sehr starke Nettofiltration konnte zur Auswertung nicht herangezogen werden, da sie für den weiteren Verlauf dieses Versuchsabschnittes nicht repräsentativ gewesen wäre. Es wurde daher in jeweils 10-minütigen Abständen die in diesem Zeitraum erfolgte Nettofiltration ermittelt.

4.2.5.4 Kreislauf und Atmung

Die Registrierung der Atemfrequenz sowie der Kreislaufparameter Blutdruck, Perfusionsdruck und Venendruck diente zu Kontrollzwecken.

Die Messung der Atemfrequenz erfolgte durch einen an die Trachealkanüle angeschlossenen Thermowiderstand, die der Kreislaufparameter durch Kristallmembranometer der Fa.Hansen, Kopenhagen.

Die genannten Meßgrößen wurden während der Versuche kontinuierlich mit einem Mehrkanalschreiber der Fa.Schwarzer, München, registriert.

4.2.5.5. Statistische Auswertung

Zum Vergleich der Ergebnisse von Kontroll- und Ödembein wurde der t-Test für unverbundene Wertepaare angewandt. Als signifikant wurde $p < 0,05$ angesehen. In den Abbildungen erfolgte die Markierung signifikanter Ergebnisse mit Sternchen, wobei bedeuten: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Kontrollversuche

Die Kontrollversuche liefen wie alle anderen Versuche nach der oben aufgeführten Weise ab, ohne daß die zu testenden ödemprotektiven Pharmaka verabreicht wurden. Diese Versuche wurden zu Beginn und in unregelmäßigen Abständen zwischen den Verumversuchen durchgeführt und dienten sowohl zur Feststellung der Etacrynsäurewirkung als auch zur Überprüfung der Arbeitsgenauigkeit.

Durch Etacrynsäure entstanden sowohl in der Haut als auch im Muskel ein deutliches Flüssigkeits- und Proteinödem.

Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt und werden im folgenden auf den Säulendiagrammen den Ergebnissen der Verumversuche gegenübergestellt.

Tab. 2 Wirkung von Etacrynsäure auf Wasser- und Proteingehalt von Haut und Muskel der hinteren Extremität der Katze

	Haut	Muskel
Ödemflüssigkeit		
(ml/g Trocken-	$0,40 \pm 0,12$	$0,95 \pm 0,11$
gewicht)		
Ödemprotein		
(mg/g Trocken-	$0,84 \pm 0,33$	$9,54 \pm 0,70$
gewicht)		

Auffällig ist, daß der Flüssigkeitsgehalt der Muskulatur doppelt so groß ist wie der der Haut; die Proteinmenge der Muskulatur beträgt das 10-fache der Haut. Diese Ergebnisse belegen die Erwartung, daß die Haut das schlechter durchblutete Organ ist, in dem infolgedessen die schädigende Wirkung der Etacrynsäure weniger zum Tragen kommt.

Mit der Perfusion des Ödembeines mit Etacrynsäure setzte eine steil ansteigende Nettofiltration ein, deren Ausmaß während

der anschließenden Perfusion mit NaCl 0,9% wieder geringfügig abnahm. Die filtrierte Flüssigkeitsmenge betrug $13,25 \pm 2,48$ ml.

In den ersten 10 Minuten der abschließenden Perfusion mit Blut fand eine besonders ausgeprägte Nettofiltration statt; das Venenvolumen sank in dieser Zeit um $3,76 \pm 0,56$ ml. Im weiteren Verlauf sank die Stärke der Nettofiltration auf Werte um 2 ml/10 min, um gegen Ende der Endperfusion wieder auf $2,74 \pm 0,44$ ml/10 min anzusteigen. Insgesamt wurden $10,10 \pm 1,42$ ml filtriert.

In den beiden beschriebenen Versuchsabschnitten fand ein Gesamt-Flüssigkeitsübertritt von $23,34 \pm 2,36$ ml statt; zu einem Proteinübertritt kam es nur während der Endperfusion, da während der Beinspülung mit eiweißfreier Flüssigkeit gespült wurde.

Peripherer Widerstand

Die Ödementwicklung während der Endperfusion hatte einen Anstieg des Strömungswiderstandes zur Folge, der durch Messung des Perfusionsdruckes erfaßt wurde. Dieser stieg in den ersten 10 Minuten der Endperfusion rasch um 20 mm Hg und nahm im weiteren Verlauf gleichmäßig auf 40 mm Hg zu.

4.3.2. Versuche mit Benzaron

Nachdem bereits Ergebnisse vorlagen, die dem Benzaron nach intravenöser Applikation eine antiödematöse Wirkung bescheinigten, sollte nun untersucht werden, ob diese Wirkung auch nach oraler Verabreichung eintritt. Dazu wurde Benzaron in steigender Dosierung gleichzeitig mit der Narkose, d.h. 4 Stunden vor der Endothelschädigung, verabreicht.

Nach Gabe von 0,5 mg Benzaron/kg KG wurde der Flüssigkeitsübertritt in die Haut ($0,35 \pm 0,23$ ml/g Trockengewicht) im Vergleich zu den Kontrollversuchen nicht beeinflusst ($0,40 \pm 0,12$ ml/g Trockengewicht). Der Proteingehalt der Haut stieg wider Erwarten um 73% auf $1,45 \pm 0,91$ mg/g Trockengewicht. Im Muskelgewebe wurde der Übertritt von Flüssigkeit um 26%

auf $0,70 \pm 0,08$ ml/g Trockengewicht und der von Protein um 66% auf $3,23 \pm 0,30$ mg/g Trockengewicht gesenkt. (Abb. 3)

Die Ergebnisse der Benzaron-Versuche sind in Tab. 3 zusammengefaßt und in den Abb. 3 -7 dargestellt.

Tab. 3 Wirkung von Benzaron in verschiedenen Dosierungen und oraler Verabreichung auf Wasser- und Proteingehalt von Haut und Muskel der hinteren Extremität der Katze bei Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung

		Kontrollen	Benzaron 0,5 mg/kgKG
Ödemflüssigkeit (ml/g Trockengewicht)	Haut	$0,40 \pm 0,12$	$0,35 \pm 0,23$
	Muskel	$0,95 \pm 0,11$	$0,70 \pm 0,08$
Ödemprotein (mg/g Trockengewicht)	Haut	$0,84 \pm 0,33$	$1,45 \pm 0,91$
	Muskel	$9,54 \pm 0,70$	$3,23 \pm 0,30$
		Kontrollen	Benzaron 2,5 mg/kgKG
Ödemflüssigkeit (ml/g Trockengewicht)	Haut	$0,40 \pm 0,12$	$0,63 \pm 0,40$
	Muskel	$0,95 \pm 0,11$	$0,45 \pm 0,09$
Ödemprotein (mg/g Trockengewicht)	Haut	$0,84 \pm 0,33$	$1,66 \pm 0,46$
	Muskel	$9,54 \pm 0,70$	$3,09 \pm 0,98$
		Kontrollen	Benzaron 10 mg/kgKG
Ödemflüssigkeit (ml/g Trockengewicht)	Haut	$0,40 \pm 0,12$	$0,70 \pm 0,18$
	Muskel	$0,95 \pm 0,11$	$0,87 \pm 0,18$
Ödemprotein (mg/g Trockengewicht)	Haut	$0,84 \pm 0,33$	$2,40 \pm 0,96$
	Muskel	$9,54 \pm 0,70$	$10,00 \pm 1,02$

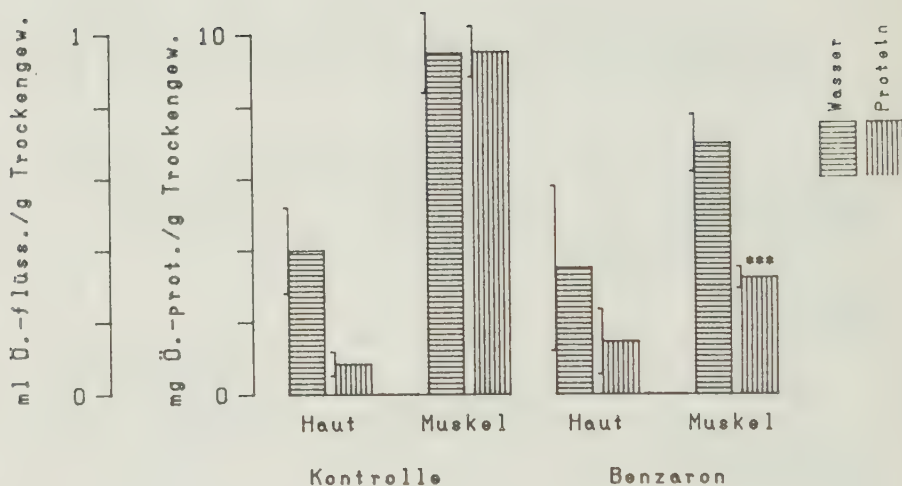


Abb. 3 Vergleich zwischen Ödemflüssigkeit und Ödemprotein in Haut und Muskel nach Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung ohne und mit Gabe von Benzarone 0,5 mg/kg KG oral

Auch nach Gabe von 2,5 mg Benzarone/kg KG nahm in der Haut die Ödemflüssigkeit um 58% auf $0,63 \pm 0,40$ ml/g Trockengewicht, das Ödemprotein um 98% auf $1,66 \pm 0,46$ mg/g Trockengewicht zu. Der Flüssigkeitsgehalt der Muskulatur wurde durch diese Dosierung um 53% auf $0,45 \pm 0,09$ ml/g Trockengewicht ($p < 0,01$), der Proteingehalt der Muskulatur um 67% auf $3,09 \pm 0,98$ mg/g Trockengewicht ($p < 0,001$) gesenkt. (Abb. 4)

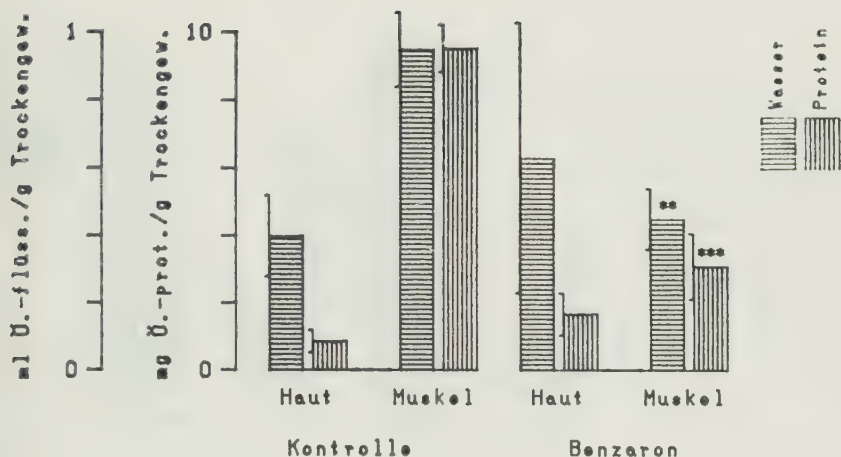


Abb. 4 Vergleich zwischen Ödemflüssigkeit und Ödemprotein in Haut und Muskel nach Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung ohne und mit Gabe von Benzaron 2,5 mg/kg KG oral

Bei den Versuchen mit 10 mg Benzaron/kg KG stieg in der Haut der Flüssigkeitsgehalt um 75% auf $0,70 \pm 0,18$ ml/g Trockengewicht, der Proteingehalt um 186% auf $2,40 \pm 0,96$ mg/g Trockengewicht an. Ödemflüssigkeit und Ödemprotein im Muskel blieben mit Werten von $0,87 \pm 0,18$ ml bzw. $10,00 \pm 1,02$ mg/g Trockengewicht unverändert. (Abb. 5)

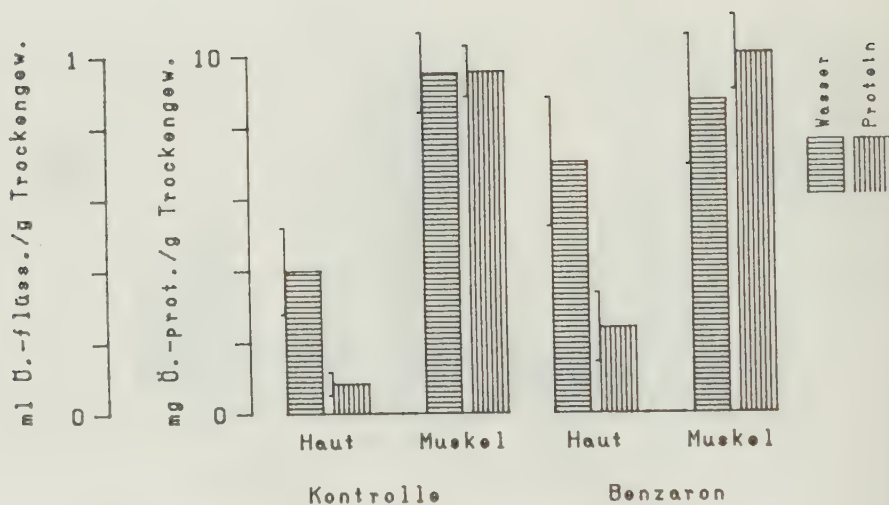


Abb. 5 Vergleich zwischen Ödemflüssigkeit und Ödemprotein in Haut und Muskel nach Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung ohne und mit Gabe von Benzaron 10 mg/kg KG oral

Nach Gabe von 2,5 mg Benzaron/kg KG war die Nettofiltration während der gesamten Schädigungsphase niedriger als bei den Kontrollversuchen; die filtrierte Menge sank um 37% auf $8,60 \pm 1,60$ ml. Bei den beiden anderen Dosierungen verlief die Nettofiltration ungefähr in gleicher Höhe wie bei den Kontrollversuchen. (Abb. 6)

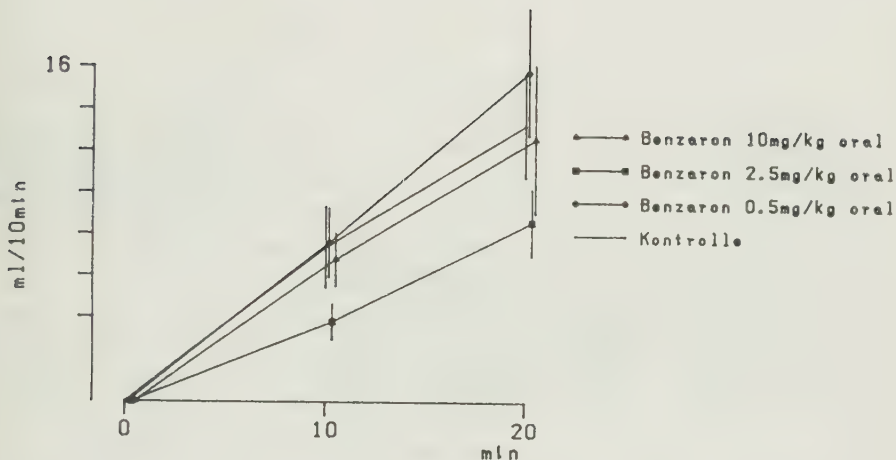


Abb. 6 Nettofiltration während der Schädigung der hinteren Extremität der Katze ohne und mit Gabe von Benzaron in verschiedenen Dosierungen

Während der Endperfusion folgte die Nettofiltration nach Gabe von 0,5 mg Benzaron/kg KG dem oben beschriebenen Verlauf der Kontrollversuche in gleicher Höhe. Nach Gabe von 2,5 und 10 mg Benzaron/kg KG war dieser typische Verlauf nicht zu beobachten; die Filtration erfolgte während der gesamten Zeit in konstanter Höhe. Dabei lagen die Werte bei 10 mg Benzaron/kg KG am niedrigsten, hier sank die während der Endperfusion filtrierte Flüssigkeitsmenge um 42% auf $5,86 \pm 1,33$ ml. (Abb. 7)

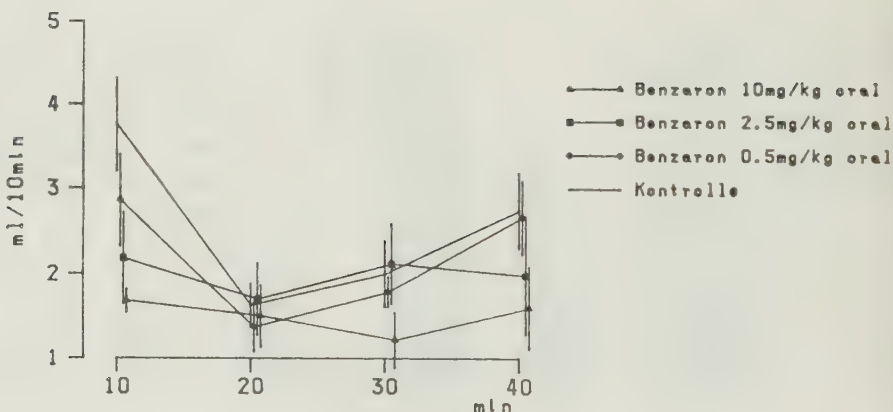


Abb. 7 Nettofiltration nach der Schädigung der hinteren Extremität der Katze ohne und mit Gabe von Benzaron in verschiedenen Dosierungen

Das Gesamtflüssigkeitsödem wurde durch 0,5 mg Benzaron/kg KG nicht beeinflusst; durch 2,5 mg Benzaron/kg KG sank es um 29% auf $16,58 \pm 3,08$ ml, durch 10 mg Benzaron/kg KG um 21% auf $18,46 \pm 4,52$ ml.

Peripherer Widerstand

Auch bei den Benzaron-Versuchen nahm der periphere Widerstand während der Endperfusion zu. Der Perfusionsdruck stieg wie bei den Kontrollversuchen in den ersten 10 Minuten um 20

mm Hg, blieb jedoch danach für den Rest der Endperfusion auf gleicher Höhe.

Die übrigen registrierten Größen -Blutdruck, Venendruck und Atmungsfrequenz- wurden durch das Benzaron nicht beeinflusst.

4.3.3. Versuche mit TMHC

4.3.3.1. Versuche mit intravenöser Applikation

Zur Überprüfung einer antiödematösen Wirkung erhielten die Versuchstiere die Substanz 30 Minuten vor Schädigung intravenös verabreicht. Überprüft wurden steigende Dosierungen des TMHC.

Der Wassergehalt der Haut veränderte sich nach Gabe von 20 und 50 mg TMHC/kg KG praktisch nicht. Er betrug $0,34 \pm 0,09$ bzw. $0,41 \pm 0,23$ ml/g Trockengewicht bei einem Kontrollwert von $0,40 \pm 0,12$ ml/g Trockengewicht. Bei den Versuchen mit 10 mg TMHC/kg KG nahm die Flüssigkeitsmenge sogar um 92% auf $0,77 \pm 0,21$ ml/g Trockengewicht zu.

Der Wasserübertritt in die Muskulatur wurde durch alle drei Dosierungen gehemmt. Der Flüssigkeitsgehalt sank bei 10 mg TMHC/kg KG um 43% auf $0,54 \pm 0,14$, nach 20 mg TMHC/kg KG um 64% auf $0,34 \pm 0,06$ und nach 50 mg TMHC/kg KG um 61% auf $0,37 \pm 0,13$ ml/g Trockengewicht.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tab. 4 und den Abb. 8 - 12.

Tab. 4 Wirkung von TMHC in verschiedenen Dosierungen bei intravenöser Verabreichung auf Wasser-und Proteingehalt von Haut und Muskel der hinteren Extremität der Katze bei Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung

		Kontrollen	TMHC 10 mg/kgKG
Ödemflüssigkeit (ml/g Trocken- gewicht)	Haut	$0,40 \pm 0,12$	$0,77 \pm 0,21$
	Muskel	$0,95 \pm 0,11$	$0,54 \pm 0,14$
Ödemprotein (mg/g Trocken- gewicht)	Haut	$0,84 \pm 0,33$	$1,83 \pm 0,97$
	Muskel	$9,54 \pm 0,70$	$4,34 \pm 0,24$

		Kontrollen	TMHC 20 mg/kgKG
Ödemflüssigkeit (ml/g Trockengewicht)	Haut	0,40 $\pm$ 0,12	0,34 $\pm$ 0,09
	Muskel	0,95 $\pm$ 0,11	0,34 $\pm$ 0,06
Ödemprotein (mg/g Trockengewicht)	Haut	0,84 $\pm$ 0,33	0,83 $\pm$ 0,62
	Muskel	9,54 $\pm$ 0,70	2,05 $\pm$ 0,33

		Kontrollen	TMHC 50 mg/kgKG
Ödemflüssigkeit (ml/g Trockengewicht)	Haut	0,40 $\pm$ 0,12	0,41 $\pm$ 0,23
	Muskel	0,95 $\pm$ 0,11	0,37 $\pm$ 0,13
Ödemprotein (mg/g Trockengewicht)	Haut	0,84 $\pm$ 0,33	0,50 $\pm$ 1,41
	Muskel	9,54 $\pm$ 0,70	5,71 $\pm$ 0,55

Ähnlich wie beim Flüssigkeitsübertritt in die Haut zeigten die untersuchten TMHC-Dosen auch keine Hemmwirkung auf den Proteinübertritt in die Haut, der nach Gabe von 20 und 50 mg TMHC/kg KG in gleichem Ausmaß stattfand, nach Gabe von 10 mg TMHC/kg KG sogar um 118% auf 1,83 $\pm$ 0,98 mg/g Trockengewicht anstieg.

Die Entstehung eines Eiweißödems in der Muskulatur wurde durch TMHC dosisabhängig gehemmt. Durch 10 mg/kg KG ließ sich eine Senkung um 54% auf 4,34 $\pm$ 0,24, durch 20 mg/kg KG eine Senkung um 78% auf 2,05 $\pm$ 0,33 mg/g Trockengewicht erreichen. Nach Gabe von 50 mg TMHC/kg KG sank der Proteingehalt nur um 40% auf 5,71 $\pm$ 0,55 mg/g Trockengewicht. Statistische Signifikanzen wurden dabei mit $p < 0,0001$ für 20 mg/kg KG, $p < 0,001$ für 10 mg/kg KG und $p < 0,01$ für 50 mg/kg KG errechnet. (Abb. 8 - 10)

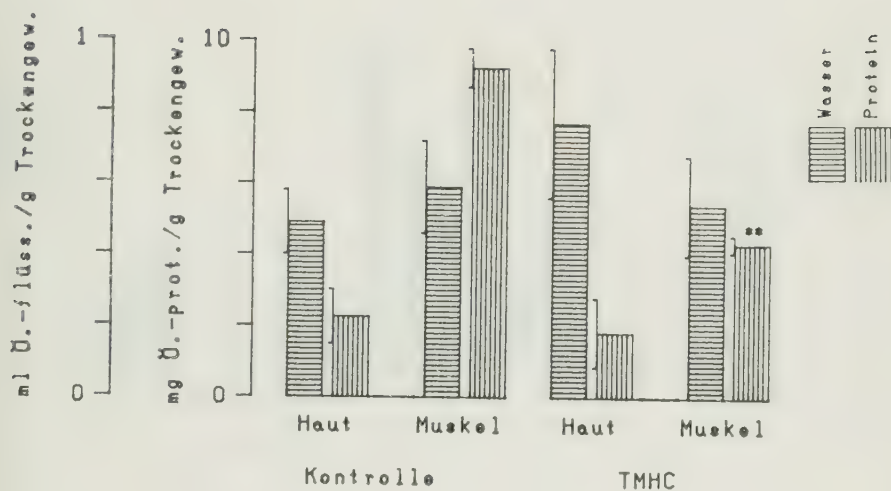


Abb. 8 Vergleich zwischen Ödemflüssigkeit und Ödemprotein in Haut und Muskel nach Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung ohne und mit Gabe von TMHC 10 mg/kg KG i.v.

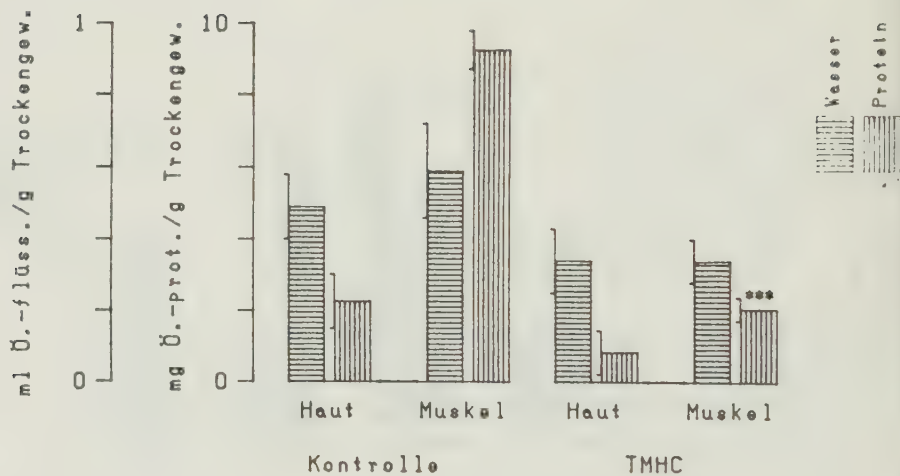


Abb. 9 Vergleich zwischen Ödemflüssigkeit und Ödemprotein in Haut und Muskel nach Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung ohne und mit Gabe von TMHC 20 mg/kg KG i.v.

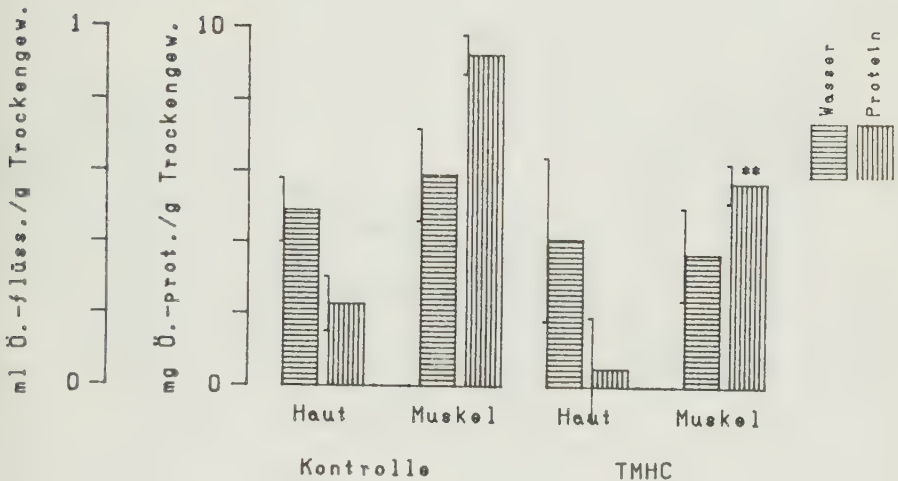


Abb.10 Vergleich zwischen Ödemflüssigkeit und Ödemprotein in Haut und Muskel nach Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung ohne und mit Gabe von TMHC 50 mg/kg KG i.v.

Durch die am stärksten wirksame Dosierung von 20 mg TMHC/kg KG wurde auch eine deutliche gleichmäßige Reduktion der filtrierten Flüssigkeitsmenge während der Schädigungsphase um 51% auf $6,50 \pm 4,56$ ml bewirkt. Durch die anderen Dosierungen blieben Verlauf und Ausmaß der Nettofiltration weitgehend unbeeinflusst. (Abb. 11)

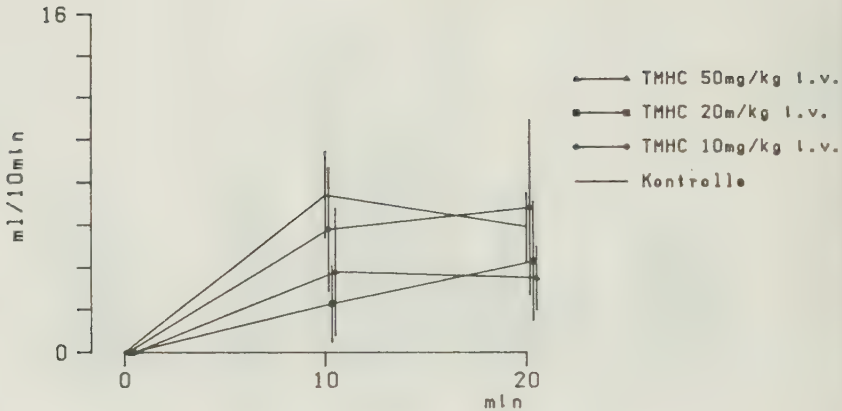


Abb.11 Nettofiltration während der Schädigung der hinteren Extremität der Katze ohne und mit Gabe von TMHC in verschiedenen Dosierungen bei i.v.-Verabreichung

Durch alle Dosierungen wurde die für die Kontrollversuche typische Verlaufskurve während der Endperfusion zugunsten einer niedrigeren über die gesamte Zeit konstanten Filtration verändert. Am deutlichsten war die Senkung nach 50 mg TMHC/kg KG (um 63% auf $3,70 \pm 2,85$ ml). (Abb. 12)

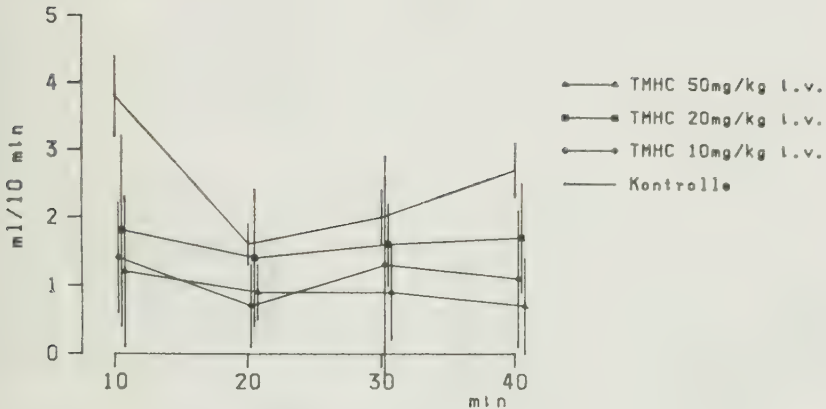


Abb.12 Nettofiltration nach der Schädigung der hinteren Extremität der Katze ohne und mit Gabe von TMHC in verschiedenen Dosierungen bei i.v.-Verabreichung

Die gesamte filtrierte Flüssigkeitsmenge sank nach 20 mg TMHC/kg KG um 44% auf $13,06 \pm 8,36$ ml, nach 50 mg TMHC/kg KG um 52% auf $11,20 \pm 7,38$ ml und gering nach 10 mg TMHC/kg KG um 26% auf $17,11 \pm 11,62$ ml.

4.3.3.2. Versuche mit oraler Applikation

Da man von einer ca. 10%-igen Resorption nach oraler Verabreichung ausgeht, und die deutlichste antiödematöse Wirkung in den intravenösen Versuchen durch 20 mg TMHC/kg KG ausgelöst worden war, wurden die oralen Versuche zum Vergleich mit den Dosierungen 100 und 200 mg/kg KG durchgeführt.

Durch diese Dosierungen konnte jedoch der Flüssigkeitsgehalt in Haut und Muskel nicht gesenkt werden; es kam sogar zu einem Anstieg des Flüssigkeitsödems in der Haut nach 200 mg TMHC/kg KG.

Bei beiden Dosierungen wurde in der Haut sogar ein höherer Proteingehalt gemessen als bei den Kontrollen, wobei wiederum die Gabe von 200 mg TMHC/kg KG zu den schlechteren Ergebnissen führte. Einzig der Proteinübertritt in die Muskulatur wurde durch TMHC in den angegebenen Dosen gehemmt, durch 200 mg/kg KG sogar signifikant ($p < 0,01$) um 61% auf $3,65 \pm 0,36$ mg/g Trockengewicht. (Abb. 13 und 14)

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tab. 5 und den Abb. 13 -16.

Tab. 5 Wirkung von TMHC in verschiedenen Dosierungen bei oraler Verabreichung 4 Stunden vor Schädigung auf Wasser- und Proteingehalt von Haut und Muskel der hinteren Extremität der Katze bei Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung

		Kontrollen	TMHC 100 mg/kgKG
Ödemflüssigkeit (ml/g Trockengewicht)	Haut	$0,40 \pm 0,12$	$0,54 \pm 0,13$
	Muskel	$0,95 \pm 0,11$	$0,76 \pm 0,20$
Ödemprotein (mg/g Trockengewicht)	Haut	$0,84 \pm 0,33$	$1,93 \pm 0,81$
	Muskel	$9,54 \pm 0,70$	$7,10 \pm 0,94$

		Kontrollen	TMHC 200 mg/kgKG
Ödemflüssigkeit (ml/g Trocken- gewicht)	Haut	0,40 $\pm$ 0,12	0,98 $\pm$ 0,33
	Muskel	0,95 $\pm$ 0,11	0,90 $\pm$ 0,26
Ödemprotein (mg/g Trocken- gewicht)	Haut	0,84 $\pm$ 0,33	2,79 $\pm$ 1,20
	Muskel	9,54 $\pm$ 0,70	3,65 $\pm$ 0,36

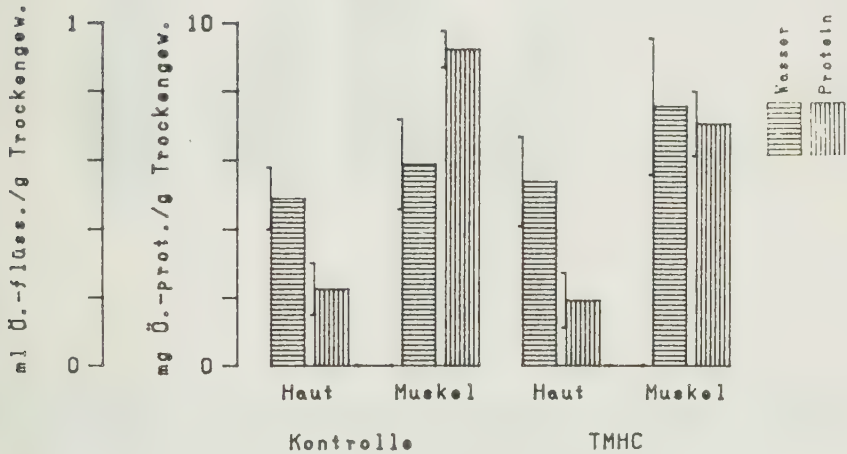


Abb.13 Vergleich zwischen Ödemflüssigkeit und Ödemprotein in Haut und Muskel nach Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung ohne und mit Gabe von TMHC 100 mg/kg KG oral

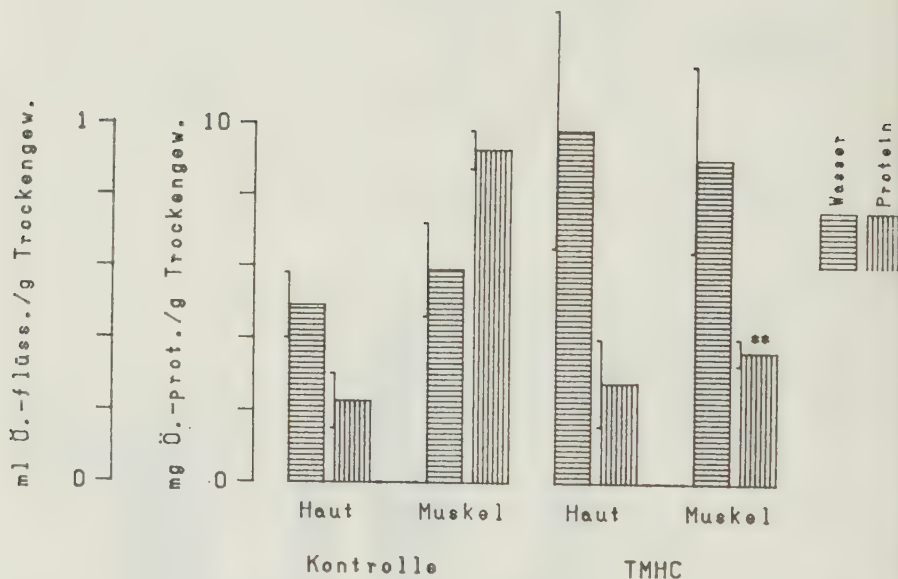


Abb.14 Vergleich zwischen Ödemflüssigkeit und Ödemprotein in Haut und Muskel nach Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung ohne und mit Gabe von TMHC 200 mg/kg KG oral

Durch 100 mg TMHC/kg KG war die Nettofiltration sowohl während der Schädigungsphase als auch während der Endperfusion gegenüber den Kontrollen geringfügig verringert. Bei 200 mg TMHC/kg KG war die filtrierte Flüssigkeitsmenge in der ersten Hälfte der Endperfusion größer, in der zweiten deutlich kleiner als bei den Kontrollversuchen. (Abb. 15 und 16)

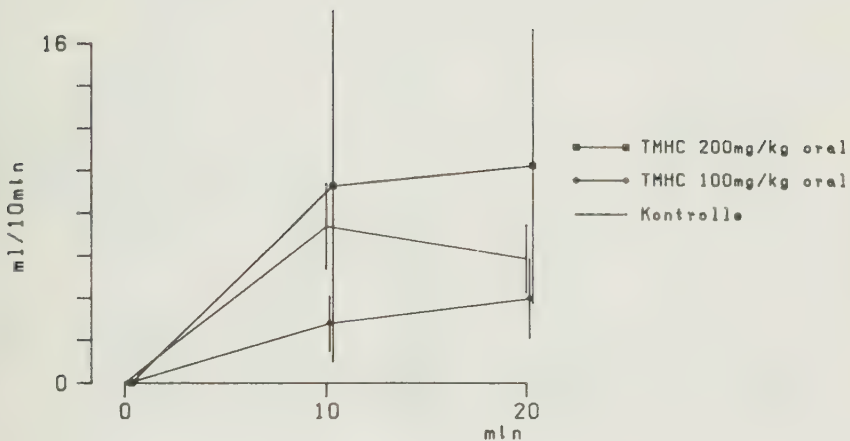


Abb.15 Nettofiltration während der Schädigung der hinteren Extremität der Katze ohne und mit Gabe von TMHC in verschiedenen Dosierungen bei oraler Verabreichung

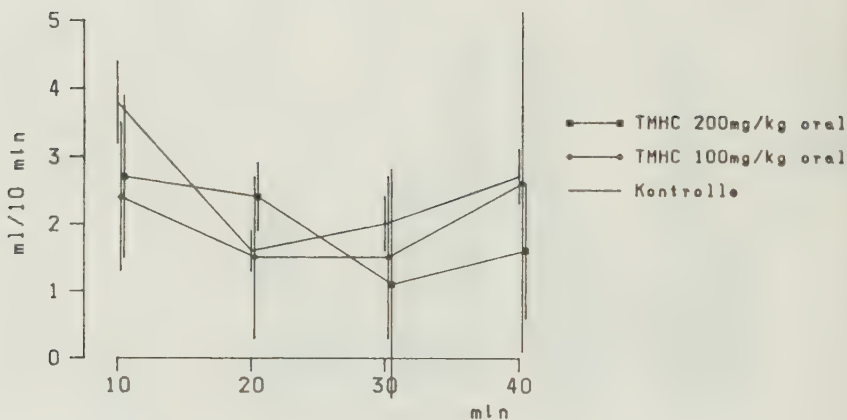


Abb.16 Nettofiltration nach der Schädigung der hinteren Extremität der Katze ohne und mit Gabe von TMHC in verschiedenen Dosierungen bei oraler Verabreichung

Die filtrierte Gesamt-Flüssigkeitsmenge wurde durch die Substanz in den angegebenen Dosierungen nicht beeinflusst.

4.3.3.3. Versuche mit oraler Applikation an aufeinanderfolgenden Tagen

Bei Versuchen, in denen HR an vier aufeinanderfolgenden Tagen oral verabreicht wurde, zeigte sich eine gute antiödematöse Wirkung der Substanz. Es sollte nun untersucht werden, ob durch "chronische" Verabreichung von TMHC ein ähnlicher Effekt erzielt werden kann.

Bei diesen Versuchen kam es zu einer geringen Zunahme des Flüssigkeits- und Proteinödems in der Haut, während diese Größen im Muskel unbeeinflusst blieben. (Abb. 17)

Die Ergebnisse sind in Tab. 6 und den Abb. 17 - 19 zusammengefaßt.

Tab. 6 Wirkung von 20 mg TMHC/kg KG an 4 aufeinanderfolgenden Tagen auf Wasser- und Proteingehalt von Haut und Muskel der hinteren Extremität der Katze bei Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung

		Kontrollen	TMHC 20 mg/kgKG/d
Ödemflüssigkeit (ml/g Trockengewicht)	Haut	0,40 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,08
	Muskel	0,95 $\pm$ 0,11	0,88 $\pm$ 0,11
Ödemprotein (mg/g Trockengewicht)	Haut	0,84 $\pm$ 0,33	1,25 $\pm$ 0,27
	Muskel	9,54 $\pm$ 0,70	8,95 $\pm$ 0,78

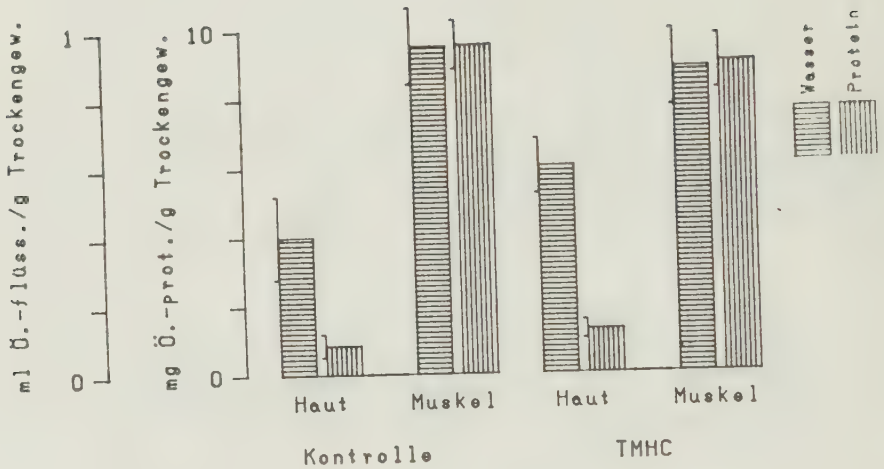


Abb.17 Vergleich zwischen Ödemflüssigkeit und Ödemprotein in Haut und Muskel nach Schädigung mit Etacrynsäure als 0,1%-iger Lösung ohne und mit Gabe von 20 mg TMHC/kg KG oral an 4 aufeinanderfolgenden Tagen

Die Flüssigkeitsnettofiltration war während der Schädigungsphase gleich, während der Endperfusion sogar größer als bei den Kontrollen.

Die filtrierte Gesamtflüssigkeitsmenge lag geringfügig über den Kontrollwerten. (Abb. 18 und 19)

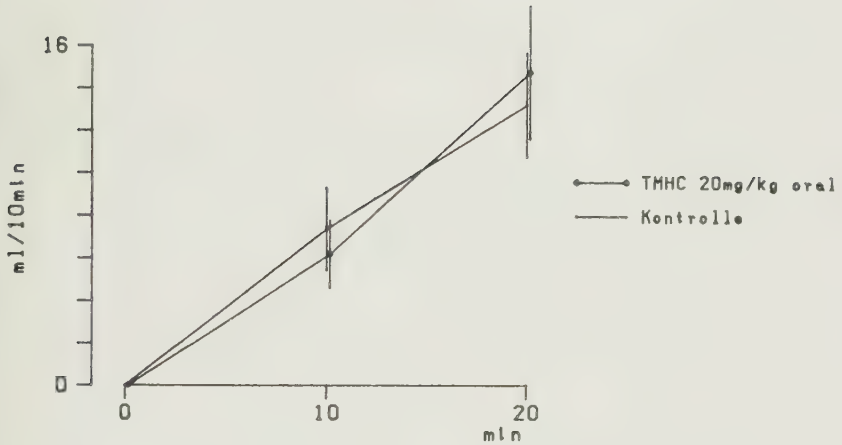


Abb.18 Nettofiltration während der Schädigung der hinteren Extremität der Katze ohne und mit Gabe von 20 mg TMHC/kg KG oral an 4 aufeinanderfolgenden Tagen

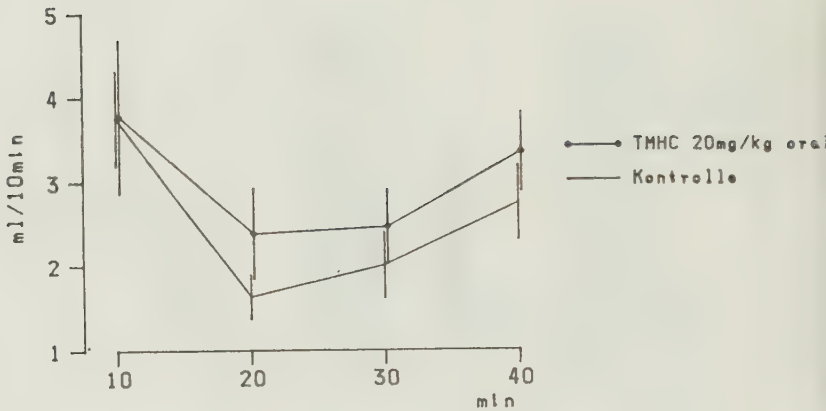


Abb.19 Nettofiltration nach der Schädigung der hinteren Extremität der Katze ohne und mit Gabe von 20 mg TMHC/kg KG oral an 4 aufeinanderfolgenden Tagen

Peripherer Widerstand

Bei Versuchen mit oraler Verabreichung des TMHC konnte ein ähnliches Verhalten des Perfusionsdruckes festgestellt werden wie bei den Benzaron-Versuchen: nach einem anfänglichen raschen Anstieg des Perfusionsdruckes um 20 mm Hg erfolgte keine weitere Zunahme des peripheren Widerstandes.

Bei den Versuchen mit intravenöser Verabreichung des TMHC jedoch fehlte diese erste Phase der Widerstandszunahme, es kam hingegen zu einem allmählichen Anstieg des

Perfusionsdruckes um 20 mm Hg während der gesamten Endperfusion.

Blutdruck, Venendruck und Atmungsfrequenz wurden durch keine der untersuchten Dosierungen beeinflusst.

5. Diskussion

5.1. Anmerkungen zur Methodik

5.1.1. Proteinmarkierung mit Evans blue

In der verwendeten 2%igen Lösung ist das zur Proteinmarkierung angewandte Evans blue zu nahezu 100% an Plasmaprotein gebunden (Beach und Steinetz, 1961; Felix 1978 b), d.h. aus der nachgewiesenen Farbstoffkonzentration im Interstitium kann die Menge der vorhandenen Plasmakonzentration errechnet werden. Die Miterfassung von Gewebeproteinen, die von dem aus den Gefäßen austretenden freien Farbstoff markiert werden, führt zu einer Meßungenauigkeit, die jedoch vernachlässigt werden kann, da sie sehr gering ist und Kontroll- und Ödembein gleichermaßen betrifft.

5.1.2. Präparation

Durch das Abbinden des Ödembeins mit Plastikbändern wird neben den Gefäßkollateralen auch der Lymphabfluß des Beines unterbrochen, über den normalerweise der Transport der "lymphpflichtigen Eiweiß- und Wasserlast" (Földi 1984) erfolgt. Man muß daher annehmen, daß das im Gewebe des Ödembeins zurückgehaltene Eiweiß auf dem Weg über eine Erhöhung des onkotischen Druckes zu einer Verstärkung des Wassereinstroms in das Gewebe, d.h. also zu einer Verstärkung des Ödems führt. Eine erhöhte Strömungsgeschwindigkeit in den verbliebenen Lymphbahnen (Földi 1984) oder eine Öffnung lymphovenöser Anastomosen (Schneider 1975) dürften nicht ausreichen, um den Ausfall der Funktion der abgebundenen Lymphwege zu kompensieren. Da von dieser präparationsbedingten Veränderung jedoch Kontroll- und Verumversuche gleichermaßen betroffen sind, kann die daraus entstehende Ungenauigkeit bei der Auswertung vernachlässigt werden.

5.1.3. Perfusionstechnik

Die strömungskonstante Perfusion erlaubt das Gleichbleiben von Durchblutung und Stromstärke im venösen Gefäßschenkel unabhängig vom peripheren Widerstand. Änderungen des Arteriole-tonus wirken sich nur in Änderungen des Druckes aus, mit dem das Blut durch diese Gefäße fließt. Sie werden durch die Messung des Perfusionsdruckes erfaßt.

5.1.4. Venenvolumen

Die in die venöse Meßstrecke eingeschaltete Überlaufkammer ermöglicht die Erfassung einer arteriovenösen Strömungsdifferenz. Diese kann durch

- eine Änderung des Venentonus oder
- ein Ungleichgewicht im Flüssigkeitsaustausch

zustande kommen.

Änderungen des Venenvolumens können

- aktiv durch Tonusänderungen der Venen (Kontraktion führt zu vermehrtem Blutfluß in die Überlaufkammer) oder
- passiv durch Veränderungen des transmuralen Druckes

hervorgerufen werden.

Der transmurale Druck kann durch Erhöhung der Stromstärke und des venösen Ausflußdruckes angehoben werden. Diese beiden Größen werden jedoch in den Versuchen durch die strömungskonstante Perfusion und die gleichbleibende Höhe der Überlaufkammer konstant gehalten.

Berücksichtigt man nun noch, daß eine Änderung des Venentonus zu kurzzeitigen Volumenänderungen führt, es sich bei den Veränderungen nach Applikation der Etacrynsäure jedoch um langandauernde Veränderungen handelt, so kann man daraus schließen, daß diese Ausdruck eines Ungleichgewichtes im Flüssigkeitshaushalt sind.

5.1.5. Beinspülung

Es wäre denkbar, daß allein durch die Perfusionstechnik und die während der Beinspülung herrschende Ischämie eine Schädigung der Gefäße ausgelöst wird. Versuche, bei denen - unter sonst identischen Bedingungen - die Beinspülung ausschließlich mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt wurde, hatten jedoch keine Auswirkung auf den transkapillären Flüssigkeitsaustausch (Felix 1978 b).

Um den Einfluß des hydrostatischen Druckes in den Kapillaren auf den Flüssigkeitsaustausch möglichst gering zu halten, wurde der venöse Ausflußdruck auf Null gesenkt.

Die während der Schädigungsphase zu beobachtende Nettofiltration dürfte daher größtenteils auf die fehlende osmotische Anziehungskraft der Spülflüssigkeit zurückzuführen sein.

5.2. Eigene Ergebnisse

Die von uns untersuchten Pharmaka hatten sich bereits in einer Reihe von Versuchen als antiödematös wirksam erwiesen (z.B. Deltour et al. 1963, Gabor 1968, Chaillet et al. 1970, Felix 1978 und 1978 a, Zollner 1981).

Aus diesen Ergebnissen Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit der Substanzen bei der Behandlung der chronisch venösen Insuffizienz zu ziehen, ist jedoch nur bedingt zulässig.

Die Pharmaka wurden bei den genannten Versuchen intravenös oder intraperitoneal verabreicht. Da in der Praxis ein derartiges Vorgehen nicht durchführbar ist, mußte die Wirkung der Substanzen nach oraler Verabreichung untersucht werden. Aufgrund pharmakokinetischer Überlegungen war keine antiödematöse Wirkung zu erwarten, da gut wasser- und schlecht fettlösliche Substanzen durch die Mucosa des Magen- Darm- Traktes nur in geringem Ausmaß resorbiert werden und keine wirksamen Konzentrationen entstehen können. Diesen Überlegungen, die auch für TMHC und Benzaron zutreffen, widersprechen jedoch Arbeiten von Förster (1978), der nach oraler Verabreichung von Rutosiden eine etwa 4-10%-ige Resorption nachweisen konnte. Zum anderen handelte es sich bei den Ödemmodellen um sogenannte "entzündliche Ödeme", während beim Ödem der chronisch venösen Insuffizienz ein nichtentzündliches Ödem vorliegt. Ein für die Therapie der CVI eingesetztes antiödematös wirksames Pharmakon muß also mehr als nur antiphlogistische Wirksamkeit besitzen.

Histologische Untersuchungen von Hammersen und Hammersen (1983) am Ödemmodell von Felix zeigten, daß durch die Etacrynsäure ein nichtentzündliches Ödem entsteht, das durch intravasale Zellaggregate, die jedoch nur selten zu Verschlüssen kleinerer Gefäße führen, und für das Etacrynsäureödem charakteristische "Endothelblasen", die durch schnellen Wassereinstrom in die Zellen nach der Schädigung entstanden sind, gekennzeichnet ist. Für die Erklärung der gesteigerten Permeabilität war der Nachweis von Endothelabflachungen und tiefen Invagina-

tionen der luminalen Zellmembran bedeutsam: durch die genannten Erscheinungen kommt es zu einer Vergrößerung der Diffusionsfläche bei gleichzeitiger Verkürzung der Diffusionsstrecke, wodurch sowohl der Übertritt von Wasser als auch der vesikale Transport von Makromolekülen erleichtert wird.

Auf biochemischer Ebene wird die Wirkung von Etacrynsäure in einer Entkoppelung der Atmungskette gesehen. Dabei werden innerhalb der Atmungskette die Oxidations- von den Phosphorylierungsvorgängen abgetrennt, wodurch weniger energiereiche Phosphate aber dafür mehr Wärme entsteht (Harper, 1975). Durch die Endothelschädigung mit Etacrynsäure wird also eine ähnlich schlechte Stoffwechsellage ausgelöst wie durch die bei der chronisch venösen Insuffizienz herrschende anaerobe Stoffwechsellage. Letztere führt ebenfalls zu einer geringen Bereitstellung von energiereichen Phosphaten und zu morphologischen Veränderungen der Venenwände durch Veränderungen von Membranbestandteilen und Aktivierung lysosomaler Enzyme (Buddecke 1976, Laszt 1976). Ähnliche Vorgänge sind nach der Schädigung mit Etacrynsäure ebenfalls zu diskutieren.

Bei dem entstandenen Entacrynsäureödem fällt die stärkere Ausprägung im Muskel und dabei vor allem das -im Vergleich zur Haut- über 10-fach deutlichere Proteinödem auf. Es scheint also, daß nicht nur die Muskulatur der Katzen besser durchblutet ist als die Haut, sondern daß auch Muskelgefäße für Eiweiß durchlässiger sind als die Hautgefäße.

Daß sich ein derart ausgeprägtes Ödem in nahezu allen Versuchen verringern ließ, ist ein deutlicher Beweis für die antiödematöse Wirksamkeit der untersuchten Pharmaka, legt jedoch auch den Gedanken nahe, daß ein Ödem derartigen Ausmaßes für die Pharmaka leichter zu beeinflussen ist als eines geringerer Ausprägung.

Benzaron

Die kapillarabdichtende Wirkung des Benzarons wurde von Felix an verschiedenen Ödemformen untersucht (Chloroformödem 1978 a, Thiopental- und Polidocanolödem 1978). Da sich dabei jeweils eine Hemmung der Ödementstehung nachweisen ließ, jedoch unterschiedliche Entstehungsmechanismen vorliegen, nimmt Felix eine unspezifische Wirkung des Benzarons an. Als Wirkungsmechanismus diskutiert er, da ein direkter Antagonismus Benzaron - Ödemerzeugende Substanz nicht in Frage kommt, eine kompetitive Hemmung durch Bindung sowohl der Ödemerzeugenden als auch der Ödemprotektiven Substanz an die Gefäßwand. Zollner (1981) diskutiert eine Hemmung der Wirkung von biogenen Aminen und Kininen (Deltour 1963, Chaillet 1970), die bei entzündlichen und allergischen Reaktionen Vermittler der erhöhten Kapillarpermeabilität sind.

Zollner (1981) stellte -ebenfalls am Ödemmodell von Felix- eine Hemmung der Ödemerzeugenden Wirkung von Etacrynsäure fest. Er verabreichte 2 mg Benzaron/kg KG intravenös.

Auch bei den von uns durchgeführten Versuchsreihen mit oraler Applikation konnte -entgegen den oben aufgeführten pharmakokinetischen Überlegungen, die keine Wirksamkeit erwarten ließen- eine Hemmung der Ödementstehung nach Gefäßschädigung durch Etacrynsäure festgestellt werden. Die stärkste Wirksamkeit entfaltete dabei die Gabe von 2,5 mg Benzaron/kg KG. Verglichen mit den oben genannten Ergebnissen von Zollner kann also eine 100%-ige Resorption des Benzarons nach oraler Applikation gefolgert werden.

Die antiödematöse Wirkung des Benzarons bestand dabei bereits unmittelbar nach der Endothelschädigung und hielt während der gesamten weiteren Versuchsdauer an und führte zu einer deutlichen Senkung der Flüssigkeitsnettofiltration.

Bemerkenswert ist dabei, daß eine Dosissteigerung auf 10 mg /kg KG nicht zu einer Wirkungssteigerung führte und die Größe des entstandenen Ödems der der Kontrollversuche glich. Bei dieser Dosierung ist die Dosis mit der optimalen Wirkung

bereits überschritten, und es dürfte durch das Wirkstoffüberangebot zu einem "Kampf" um die zur Verfügung stehenden Bindungsstellen und einer Verringerung der Wirkung kommen.

Auf eine Prüfung der Substanz nach chronischer Verabreichung, d.h. nach mehrtägiger niedrigdosierter Applikation, wurde verzichtet, da bei den Akutversuchen bereits nach Gabe geringer Benzaronmengen eine deutliche ödemprotektive Wirkung eintrat.

Neben den genannten Eigenschaften, die das Benzaron als ideales Venentherapeutikum erscheinen lassen, beeinflusst diese Substanz jedoch auch die Durchblutung von Haut und Muskulatur. In unseren Versuchsreihen war bei allen Dosierungen eine Steigerung der Hautdurchblutung eingetreten, die zu einer Zunahme von Protein- und Flüssigkeitsödem gegenüber den Kontrollversuchen geführt hat. In wieweit diese Eigenschaft den therapeutischen Einsatz limitiert, muß in klinischen Studien untersucht werden.

Trimethylhesperidinchalkon

Auch die antiödematöse Wirkung von TMHC wurde in zahlreichen Versuchsreihen (vgl. 3.3.) nachgewiesen. Doch obwohl bei Tierversuchen erst bei Dosierungen von 50 mg/kg KG i.v. und mehr antiödematöse Effekte festgestellt werden konnten (Felix 1985), und man nach oraler Applikation nur eine etwa 10%-ige Resorption annimmt (Felix 1985), wird TMHC therapeutisch in sehr viel geringeren Dosen (5-20 mg/d) mit gutem Erfolg angewandt. Der Grund für die Wirksamkeit des TMHC nach oraler Verabreichung niedriger Dosen wird zum einen in den unterschiedlichen Eliminationswegen gesehen. Der raschen Anflutung der Substanz nach intravenöser Injektion folgt eine rasche renale Elimination, die Plasma- Halbwertszeit liegt zwischen 30 und 45 Minuten. Nach oraler Verabreichung unterliegt das TMHC einem enterohepatischen Kreislauf (Chanal 1981), nach anfänglichem Abfall kommt es zu einem 2. Anstieg der Plasmakonzentration. Felix (1985) berichtet, daß -bei einer Plasma-Halbwertszeit von einigen Stunden- die Halbwertszeit der

Wirkung ungefähr bei 24 Stunden liegt, was man sich durch eine Bindung der Substanz an ihren Wirkort erklärt. Zum anderen erfolgt die Gefäßschädigung im Experiment innerhalb von Minuten, während die morphologischen Veränderungen beim Menschen über einen langen Zeitraum entstehen. Es ist denkbar, daß zur Behandlung dieser chronischen Prozesse niedrigere Plasmaspiegel ausreichend sind.

Bei den Versuchen mit intravenöser Verabreichung konnte die Ödementstehung durch alle Dosierungen gehemmt werden, die des Proteinödems im Muskel sogar signifikant. Die stärkste Wirkung wurde jedoch durch Gabe einer mittleren Dosierung von 20 mg/kg KG erzielt.

Eine Dosissteigerung auf 50 mg/kg KG führte dagegen zu einer Abnahme der Hemmwirkung. Es scheint also, daß bei mittleren Dosierungen eine optimale Sättigung der TMHC-Bindungsstellen erreicht ist, nach deren Überschreiten nicht nur keine Wirkungssteigerung möglich ist, sondern sogar eine Wirkungsabnahme eintritt.

Nach intravenöser Verabreichung war die hemmende Wirkung auf die Flüssigkeitsnettofiltration bereits während der Schädigungsphase vorhanden, während der Endperfusion war diese jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Der Grund dafür ist in der sehr kurzen HWZ (30 - 45 min) des TMHC nach intravenöser Applikation zu sehen. Die 45-minütige Endperfusion beginnt erst 65 Minuten nach der TMHC-Injektion, zu einem Zeitpunkt also, zu dem nur noch geringe Plasmaspiegel des Wirkstoffes vorhanden sind.

Zur Untersuchung der Wirksamkeit nach oraler Applikation wurden Versuche durchgeführt, bei denen den Tieren die 10-fache Menge der intravenös wirksamen Dosis oral verabreicht wurde.

Dabei wurde das Ödem durch Gabe von 100 mg/kg KG nicht beeinflusst, nach Gabe von 200 mg/kg KG nahm einzig das Proteinödem im Muskel ab.

Aufgrund dieser festgestellten Ödemhemmung kann als nachgewiesen gelten, daß TMHC -entgegen den Überlegungen- nach oraler

Verabreichung wirksam ist. Da die antiödematöse Wirkung nach oraler Applikation etwas geringer war als bei den zum Vergleich herangezogenen intravenösen Versuchen, kann man von einer Resorption von etwa 8 - 10% nach oraler Applikation ausgehen.

Die Flüssigkeitsnettofiltration während Schädigungsphase und Endperfusion wurde durch keine der untersuchten Dosierungen signifikant gehemmt. Die deutliche Abnahme der Nettofiltration in der 2.Hälfte der Endperfusion nach Gabe von 200 mg TMHC/kg KG ist wohl als Auswirkung der von Chanal et al. (1981) beschriebenen Pharmakokinetik des TMHC nach oraler Applikation anzusprechen. Die Autoren wiesen nach oraler Applikation einen Abfall der Plasmaspiegel mit niedrigsten Werten nach 4 Stunden nach, dem ein durch einen enterohepatischen Kreislauf bedingter Wiederanstieg der Plasmaspiegel folgte.

Bei unseren Versuchen erfolgte die Endothelschädigung 4 Stunden nach Pharmakongabe, zum Zeitpunkt der niedrigsten Plasmawirkspiegel, die für eine Ödemhemmung nicht ausreichen. Daß dennoch die Entstehung des Proteinödems in der Muskulatur gehemmt werden konnte, unterstreicht den Gedanken, daß sich dieses stark ausgeprägte Ödem am leichtesten -auch von geringen Plasmakonzentrationen- beeinflussen läßt. Als Korrelat für die unter Einfluß des enterohepatischen Kreislaufes steigenden Plasmaspiegel stellten wir eine Abnahme der Nettofiltration ungefähr 5 Stunden nach Pharmakongabe fest.

Aufgrund der sehr hohen Dosen, die bei oraler Applikation zur Erzielung einer antiödematösen Wirkung notwendig waren, überprüften wir, ob durch chronische, d.h. an 4 aufeinanderfolgenden Tagen erfolgende Verabreichung geringer TMHC-Mengen eine Ödemhemmung bewirkt werden kann.

Nieberle (1985) und Schmidt (1985) konnten ein derartiges Phänomen bei Versuchen mit O-(β -Hydroxyethyl-)rutosiden (HR) nachweisen. Sie stellten bei der Gegenüberstellung von Versuchen mit HR nach intravenöser Gabe, oraler Gabe 4 Stunden vor Endothelschädigung und chronischer Verabreichung fest, daß sowohl akute als auch chronische orale Verabreichung wirksamer waren als intravenöse Applikation, wobei durch

chronische Verabreichung von 20 mg HR/kg KG/d etwa die gleiche Hemmwirkung ausgelöst wurde wie durch akute Gabe der 10-fachen Menge. Als Gründe für diese Erscheinung nehmen sie eine höhere Absorptionsrate bei niedrigen Dosen, eine begrenzte Aufnahmekapazität des für die Resorption postulierten aktiven Transportes sowie eine vernachlässigbar geringe renale Elimination bei niedrigen Plasmaspiegeln an. Darüberhinaus tragen die durch den enterohepatischen Kreislauf des HR bedingte lange 2.Halbwertszeit (größer als 20 Stunden) und die hohe Gewebeverankerung zur antiödematösen Wirksamkeit des HR nach chronischer Verabreichung bei.

Bei analog zu den Versuchen von Nieberle und Schmidt durchgeführten Versuchen, bei denen 20 mg TMHC/kg KG/d oral verabreicht wurden, wurde weder Ödementstehung in Haut und Muskel noch Nettofiltration beeinflusst.

Die Überlegungen zu Resorption und renaler Elimination sind jedoch für HR und TMHC gleichermaßen zutreffend (vgl. Griffiths und Barrow 1972 und Chanal et al. 1981). Die Wirkungslosigkeit des TMHC nach chronischer Applikation muß also andere Gründe haben. Zum einen dürfte dafür die kürzere etwa 8-stündige Plasma- Halbwertszeit des TMHC verantwortlich sein. Zum anderen besteht beim TMHC wohl eine geringere Gewebeverankerung als beim HR, wodurch nach Gabe gleicher Dosen beim TMHC kein wirksamer Plasmaspiegel entsteht.

6. Zusammenfassung

Die Versuche wurden an dem von Felix und Remien (1978) beschriebenen Ödemmodell durchgeführt. In Chloralosenarkose wurde in einer strömungskonstant perfundierten vom systemischen Kreislauf abgetrennten hinteren Extremität der Katze Etacrynsäure appliziert. Durch diese Schädigung wurden die Gefäße dieser Extremität durchlässig für Flüssigkeit und Eiweiß. In Haut und Muskulatur wurden Protein und Flüssigkeitsgehalt des Gewebes ermittelt und mit den Ergebnissen der anderen hinteren Extremität verglichen.

Um Aufschluß über wirksame Dosierungen, Resorption und Einfluß der Applikationsform zu erhalten, wurden Benzaron und TMHC in verschiedenen Dosierungen und Verabreichungsformen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Benzaron nach oraler Verabreichung zu 100% resorbiert wird und bereits in niedrigen Dosen die Entstehung eines Flüssigkeits- und Proteinödems signifikant hemmt. Eine Dosissteigerung führte zur Aufhebung der ödemprotektiven Wirkung. Neben der Ödemhemmung in der Muskulatur führte Benzaron zu einer Steigerung der Hautdurchblutung und zur Entstehung eines Hautödems.

Beim TMHC ergab sich nach i.v.-Applikation ebenfalls ein Wirkungsmaximum bei mittleren Dosierungen und ein Wirkungsabfall nach Dosissteigerung.

Nach oraler Gabe von 200 mg TMHC/kg KG wurde die Entstehung des Proteinödems im Muskel signifikant gehemmt. Es wird also auch das TMHC nach oraler Verabreichung resorbiert, die Resorptionsquote liegt bei etwa 8 - 10%.

Nach chronischer oraler Verabreichung von 20 mg TMHC/kg KG/d zeigte sich keine ödemprotektive Wirkung. Da eine solche nach chronischer Applikation von O-(β -Hydroxyethyl)-rutosiden jedoch vorlag, wird gefolgert, daß beim TMHC eine geringere Gewebeverankerung als beim HR besteht.

7. Literaturverzeichnis

1. Balis, G.U., R.R. Monroe
The pharmacology of chloralose, review
Psychopharmacologia 6:1-30 (1964)
2. Barchewitz, G., R. Brotelle, A. Guilbert, L. Chotard,
R. Charlier
Recherches dans la série des benzofurannes
XLVI. Effet thrombolytique de la benzarone
Arzneimittel-Forsch./Drug Research 22, Nr. 3: 553-558
3. Bass, B.G., N.M. Buckley
Chloralose Anesthesia in the Dog: A Study of Drug Actions
and Analytical Methodology
Am. J. Phys. 210: 854-862 (1966)
4. Beach, V.L., B.G. Steinetz
Quantitative Measurement of Evans Blue Space in the Tissues
of the Rat: Influence of 5-hydroxytryptamin Antagonists
and Phenelzine on Experimental Inflammation
J. Pharmacol. exp. Therap. 131: 400-406 (1961)
5. Binon, F.
Chemie des Benzaron (Fragivix)
In: Ergebnisse der Angiologie Bd. 11: 79-81
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1976)
6. Birke, E.R.
Eine interne Therapie bei Venenleiden alter Menschen
Ärztl. Praxis 77: 2655-2658 (1967)
7. Böhm, K.
Die Flavonoide
Editio Cantor, Aulendorf (1967)
8. Broekhuysen, J.
Pharmakokinetik von Benzaron beim Tier und beim Menschen
In: Ergebnisse der Angiologie Bd. 11: 97-107
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1976)
9. Brotelle, R.
Die antithrombotischen Eigenschaften von Benzaron
In: Ergebnisse der Angiologie Bd. 11: 83-95
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1976)

10. Buddecke, E.
Chemie und Stoffwechsel des Venengewebes
Therapiewoche 26:5088-5098 (1976)
11. Chaillet, F., G. Barchewitz, R. Charlier, A. Guilbert,
M. Colot, G. Deltour
Recherches dans la série des benzofurannes
XLIII. Propriétés angéiotrophiques, antiinflammatoires
et fibrinolytiques de la benzarone
Arzneimittel-Forsch./Drug Research 20, Nr. 3:358-363
12. Chanal, J. L., H. Cousse, M. T. Sicart, B. Bonnaud, R. Maignan
Absorption and Elimination of (¹⁴C)Hersperidin methyl
chalcone in the Rat
Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 6, Nr. 3:171-177 (1981)
13. Charlier, R.
Wirkung von Fragivix auf die Kapillarfragilität und die
Kapillarpermeabilität
In: Ergebnisse der Angiologie Bd. 11:109-117
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1976)
14. Deltour, G., F. Binon, R. Charlier
Recherches dans la série des benzofurannes
VIII. Effet de certaines dérivés benzofuranniques sur
la fragilité et perméabilité capillaire
Arch. int. Pharmacodyn. 145, Nr. 3-4:356-377 (1963)
15. Deltour, G., R. Charlier, F. Binon
Recherches dans la série des benzofurannes
X. Etude pharmacologique et toxicologique de l'éthyl-
2-(hydroxy-4-benzoyl)-3-benzofuranne
Arch. int. Pharmacodyn. 154, Nr. 1:94-107 (1965)
16. Duggan, D. E., R. M. Noll
Effects of Ethacrynic Acid and Cardiac Glykosides
upon a Membrane Adenosinetriphosphatase of Renal Cortex
Arch. Biochem. 109:388-396 (1965)
17. Estler, J.
Zur Pharmakologie der Bioflavonoide
Fortschr. Med. 89:669-671 (1971)

18. Felix, W.
Strömungsmessung mit Thermistoren
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 244:254-269 (1962)
19. Felix, W.
Pharmakologische Grundlagen der Diuretika-Therapie bei
gestörter Volumenregulation
Med. Welt 29:186-190 (1970)
20. Felix, W.
Medikamentöse Therapie bei venösen Abflußstörungen
Therapiewoche 32:3366-3370 (1974)
21. Felix, W.
Über den Einfluß des Benzarons auf das Polidocanol- und
Thiopental-Ödem am Hinterlauf der Katze
Arzneimittel-Forsch./Drug Research 28(12):2300-2302
(1978 a)
22. Felix, W.
Zur Wirkung von O-(β -Hydroxyethyl)-rutosiden auf die
Ödembildung durch Ethoxysklerol am Hinterlauf der Katze
In: O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside - experimentelle und
klinische Ergebnisse
W. Voelter und G. Jung (Hrsg.)
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1978 b)
23. Felix, W.
Pharmakotherapie bei venösen Durchblutungsstörungen
Sonderdruck aus: Ergebnisse der Angiologie Bd. 17
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
24. Felix, W.
Medikamentöse Therapie bei venösen Durchblutungsstörungen
des Beines
Der Hautarzt 30:198-201 (1979)
25. Felix, W.
Zum Problem "Venenmittel"
Med. Welt 31(21):813-816 (1980)
26. Felix, W.
Die Wirkung seriöser Venenmittel läßt sich objektivieren
In: Fortschritte der Medizin
Bericht von einem Presse-Workshop am 11.1.85 in
Rottach-Egern

27. Felix,W., P.Fuchs, S.Schmalholz
Zur ödemprotektiven Wirkung von Troxerutin unter dem Einfluß
von Dihydroergotamin
Phlebol.u. Proktol. 1: 73-77 (1984)
28. Felix,W., K. Hällfritzsch
Wirkungen des Benzarons auf das Chloroform-Ödem der Maus
und am Meerschweinchen auf den Petechien-Test
Arzneimittel-Forsch./Drug Research 28 (II) (12):2297-2299
(1978)
29. Felix,W., J.Nieberle, G.Schmidt
Wirksamkeit von O-(β -Hydroxyethyl)-rutosiden bei peroraler
Applikation und Unspezifität ihrer protektiven Wirkung
In: O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside - neue Ergebnisse in
Experiment und Klinik S.65-74
W.Voelter und G. Jung (Hrsg.)
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1983)
30. Felix,W., J.Remien, K.Hällfritzsch
Zur Messung von Venenreaktionen im Tierversuch
Pflügers Arch.329:352-359
31. Filipovich,I., E.Buddecke
The Effect of 2-Ethyl-3-(4-hydroxybenzoyl)-benzofuran
(Benzaron) on the Metabolism of Arterial Tissue and
Cultured Arterial Smooth Muscle
Arzneimittel-Forsch.29:1578-1580 (1979)
32. Fischer,H.
Physiologie und Pathophysiologie der peripheren Ödeme
Ergebnisse der Angiologie Bd.17
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
33. Földi,M.
Lymphangitische Störungen als Bestandteil und Differential-
diagnose der chronisch-venösen Insuffizienz, sowie ihre
Therapie
In: Kompendium der Phlebologie; W.Schneider und J.Walker
(Hrsg.) S.313-340 (1984)

34. Gábor, M., A. Antal, Z. Dirner
Effect of Hesperidin-methyl-chalcone on Capillary Resistance
in the Internal Organs of the Guinea Pig and the Rat
Acta Physiol. Academiae Scientiarum Hungaricae 34:221-226
(1968)
35. Gounon, P.
Untersuchung der Kapillarpermeabilität zur objektiven
Beurteilung eines venentonisierenden Präparates
Phlebologie 33 (3):569-574 (1980)
36. Griffiths, L.A., A. Barrow
The Fate of Orally and Parenterally Administered Flavonoids
in the Mammal
Angiologica 9:162-174 (1972)
37. Haas, S., A. Vitzthum v. Eckstädt, G. Lill, I. Weichenmeier,
G. Blümel
Medikamentöse Beeinflussung eines Thrombose-Risikofaktors
bei Patienten mit Varikosis
Fortschr. Med. 100:1418-1422 (1982)
38. Hammersen, F., E. Hammersen
Zur Ultrastruktur des durch Etacrynsäure oder Polidocanol
hervorgerufenen Ödems und seine Beeinflussung
durch O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
In: O-(β -Hydroxyethyl)rutoside - neue Ergebnisse in Experiment
und Klinik S. 75-92
W. Voelter und G. Jung (Hrsg.)
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1983)
39. Havsteen, B.
Flavonoids, a Class of Natural Products of High
Pharmacological Potency
Biochem. Pharmacol. 32(7):1141-1148 (1983)
40. Laszt, L.
Die Biochemie und Pharmakologie der Venenwand
Therapiewoche 26, 5085-5086 (1976)
41. Lill, G.
Benzaron verbessert die lytische Potenz der Gefäßwand und
senkt den Serum-Lipid-Spiegel
Ärztl. Paxis 9:256-258 (1985)

42. Löffler, G., P.E. Petrides, L. Weiss, H.A. Harper
Physiologische Chemie (2. Auflage)
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1979)
43. Marshall, M.
Sozialmedizinische Bedeutung der Venenerkrankungen
Münch.med.Wschr. 126:655-656 (1984)
44. Mörl, H. et al.
Pharmakotherapeutische Beeinflussung arteriosklerotischer
Gefäßerkrankungen durch Benzaron
Münch.med.Wschr. 122:277-280 (1980)
45. Mortais, R., J.L. Cousin
Inhibitory Effect of Etacrynic Acid on Chloride Permeability
Amer.J.Physiol. 123:1485-1489 (1976)
46. Nieberle, J.
Zur Ödemprotektiven Wirkung von Trimethylhesperidinchalkon,
Ruscus-Extrakt und Ruscogenin auf das Etacrynsäureödem
am Hinterlauf der narkotisierten Katze
Dissertation, München 1985
47. Niethard, F.U., H.O. Dustmann
Rasterelektronenmikroskopische und lichtmikroskopische
und lichtoptische Untersuchungen zum Verlauf der Phlebo-
thrombose und deren therapeutische Beeinflussung durch
Benzaron im Tierexperiment
Phlebol.u.Proktol. 6:207-218 (1977)
48. Petersen, K.U., K. Heintze, L.C. Busch, O. Heidenreich
Effects of Etacrynic Acid on Electrolyte and Fluid by the
Guinea Pig Gall bladder
Arch.Pharm. 309:287-294 (1979)
49. Rudofsky, G., H. Hirche
Plethysmographische Untersuchung eines Venentherapeutikums
bei wärmebedingten hämodynamischen Veränderungen
Med.Welt 36:145-149 (1985)
50. Schmidt, G.
Zur Wirkung ödemprotektiver Substanzen auf das Etacrynsäure-
ödem am Hinterlauf der narkotisierten Katze
Dissertation, München 1985

51. Schmidt, H.
Kurze Einführung in die Chemie der Flavonoide unter besonderer Berücksichtigung der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
In: O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside - experimentelle und klinische Ergebnisse S.1-10
W.Voelter und G.Jung (Hrsg.)
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1978)
52. Schmidt, R.F., G.Thews (Hrsg.)
Physiologie des Menschen (19.Auflage)
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1977)
53. Thébault, J.J.
Untersuchungen zur Wirkung eines Phlebotonikums
Fortschr.Med. 101:1206-1212 (1983)
55. Veen, H.H.le, W.H.Fishman
Combination of Evans blue with Plasma Protein: Its Significance in Capillary Permeability Studies, Blood Dye Disappearance Curves, and its Use as a Proteine Tag
Amer.J.Physiol. 151:26-33 (1947)
56. Voelter, W., W.Stock, N.Afza, M.Przybylski, K.P.Voges, G.Jung
Flavonoide in Heilpflanzen - Vorkommen, Biosynthese und neue Methoden zur Strukturaufklärung
In: O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside - neue Ergebnisse in Experiment und Klinik S.1-24
W.Voelter und G.Jung (Hrsg.)
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1983)
57. Vogel, G., H.Ströcker
Die Wirkung von Pharmaka -insbesondere von Flavonoiden und Aescin- auf den Lymphabfluß und auf die Permeabilität der intakten Plasma-Lymphschrnke von Ratten für Flüssigkeit und definierte Makromoleküle
Arzneimittel-Forsch./Drug Research 16:1630-1634 (1966)
58. Warter, P.J., H.L.Drezner, S.Horoschak
Effect of Hesperidin and Ascorbic Acid on Capillary Fragility in Rheumatoid Arthritis
Journ.Med.Soc.N.J. 43/6:228-230 (1946)

59. Zollner, St.

Über die Wirkung von Benzaron auf das Äthoxysklerol- und Etacrynsäureödem am Hinterlauf der Katze in Chloralose-Narkose

Dissertation, München 1985

60. Zwillenberg, L.O., H.H.L. Zwillenberg, G.Bösinger

Zum Angriffspunkt von Benzaron und einigen anderen, die intrazelluläre Konzentration zyklischer Nukleotide beeinflussende Wirkstoffe

Arzneimittel-Forsch./Drug Research 32(II):1114-1120 (1982)

Lebenslauf

11.05.1959 geboren als Tochter des Chirurgen Manfred Fuchs
und seiner Frau Benigna, geb.Schauböck, in Augsburg

1965-1969 Volksschule Augsburg/Hochzoll-Nord

1969-1978 Neusprachliches Gymnasium im A.B.v.Stettenschen
Institut, Augsburg (Abitur)

1979-1985 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München

1982-1983 Experimenteller Teil der Dissertationsarbeit

30.04.1985 Approbation als Arzt

Juni 1985- Assistenzärztin in der internistischen Privatklinik

Mai 1987 Dr.med.R.May in Kreuth

Herrn Professor Dr.med.Wolfgang Felix möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Überlassung des Themas und seine stete, freundliche und hilfreiche Unterstützung bei der Abfassung der vorliegenden Arbeit danken.

Dank gilt weiterhin den Mitarbeiterinnen im Labor Felix, Frau Schubert und Frau Schneider, sowie besonders Frau Steigerwald, die mit unermüdlicher Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft -nicht nur- die Fertigstellung der Abbildungen ermöglicht hat.

Dank für aufmunternde Worte in manchen Durststrecken meiner Mitarbeiterin Susanne Schmalholz sowie vielen anderen guten Geistern. Für die tatkräftige Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit gilt mein besonderer Dank Frau Regina Pani und Herrn Priv.-Doz.Dr.med.Werner Löffler.

